

D5

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 juin 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/40497 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12P 19/34,  
C12N 15/52, 15/63, 15/11, 9/00, C12Q 1/68, C07K 16/40,  
G01N 33/53, C12N 15/10, 15/52, 9/00, C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/03311

(22) Date de dépôt international:  
27 novembre 2000 (27.11.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/15032 29 novembre 1999 (29.11.1999) FR  
60/209,800 7 juin 2000 (07.06.2000) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): JEAN-  
NIN, Pascale [FR/FR]; 52, rue Pierre Louvrier, F-92140  
Clamart (FR). PERNODET, Jean-Luc [FR/FR]; 21,  
rue des Jardins, F-94230 Cachan (FR). GUERINEAU,  
Michel [FR/FR]; 79, boulevard Saint Marcel, F-75013  
Paris (FR). SIMONET, Pascal [FR/FR]; 55, rue Pierre

Voyant, F-69100 Villeurbanne (FR). COURTOIS, Sophie  
[FR/FR]; 165, rue de Paris, F-94220 Charenton le Pont  
(FR). CAPPELLANO, Carmela [FR/FR]; 16, rue de  
Neuilly, F-94120 Fontenay sous Bois (FR). FRANCOU,  
François [FR/FR]; 76, boulevard de Lozère, F-91120  
Palaiseau (FR). RAYNAL, Alain [FR/FR]; 52, avenue des  
Tilleuls, F-91440 Bures sur Yvette (FR). BALL, Maria  
[VE/VE]; Avenue Cardenal Quintera, Res. Cardenal  
Quintero, Edif. 10, Piso 4, Apto 42, Merida. Edo.,  
Merida (VE). SEZONOV, Guennadi [RU/FR]; 16, rue  
Saint Sauveur, F-75002 Paris (FR). TUPHILE, Karine  
[FR/FR]; 39/41, boulevard Dubreuil, F-91400 Orsay (FR).  
FROSTEGARD, Asa [NO/NO]; Flateby Skogsvet 7,  
N-1450 Nesoddtangen (NO).

(74) Mandataire: BOUVET, Philippe; Aventis Pharma S.A.,  
Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165  
Antony Cedex (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING NUCLEIC ACIDS FROM AN ENVIRONMENT SAMPLE, RESULTING NUCLEIC ACIDS AND USE IN SYNTHESIS OF NOVEL COMPOUNDS

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION D'ACIDES NUCLEIQUES A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE L'ENVIRONNEMENT, ACIDES NUCLEIQUES AINSI OBTENUS ET LEUR APPLICATION A LA SYNTHESE DE NOUVEAUX COMPOSES

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing nucleic acids from an environment sample, more particularly a method for obtaining a library of nucleic acids from a sample. The invention also concerns nucleic acids of nucleic acid libraries obtained by said method their use in the synthesis of novel compounds, in particular novel compounds of therapeutic interest. The invention further concerns novel means used in the method for obtaining said nucleic acids, such as novel vectors and novel processes for preparing such vectors or recombinant host cells containing said nucleic acid. Finally, the invention concerns methods for detecting a nucleic acid of interest within a library of nucleic acids resulting from said method, and nucleic acids detected by said method and polypeptides encoded by said nucleic acids.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé de préparation d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, plus particulièrement un procédé d'obtention d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon. L'invention est également relative aux acides nucléiques ou aux collections d'acides nucléiques obtenus selon le procédé et leur application à la synthèse de nouveaux composés, notamment de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique. L'invention a également pour objet les moyens nouveaux mis en oeuvre dans le procédé d'obtention d'acides nucléiques ci-dessus, tels que de nouveaux vecteurs et des nouveaux procédés de préparation de tels vecteurs ou encore des cellules hôtes recombinantes comprenant un acide nucléique de l'invention. L'invention concerne encore des procédés pour détecter un acide nucléique d'intérêt au sein d'une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé ci-dessus, ainsi que les acides nucléiques détectés par un tel procédé et les polypeptides codés par de tels acides nucléiques.

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/40497 A2



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**Publiée:**

- *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

Procédé d'obtention d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, acides nucléiques ainsi obtenus et leur application à la synthèse de nouveaux composés

5           La présente invention concerne un procédé de préparation d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, plus particulièrement un procédé d'obtention d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon. L'invention est également relative aux acides nucléiques ou aux collections d'acides nucléiques obtenus  
10 selon le procédé et leur application à la synthèse de nouveaux composés, notamment de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique.

L'invention a également pour objet les moyens nouveaux mis en oeuvre dans le procédé d'obtention d'acides nucléiques ci-dessus, tels que de nouveaux vecteurs et des nouveaux procédés de préparation  
15 de tels vecteurs ou encore des cellules hôtes recombinantes comprenant un acide nucléique de l'invention.

L'invention concerne encore des procédés pour détecter un acide nucléique d'intérêt au sein d'une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé ci-dessus, ainsi que les acides nucléiques  
20 détectés par un tel procédé et les polypeptides codés par de tels acides nucléiques.

L'invention a également trait à des acides nucléiques obtenus et détectés selon les procédés ci-dessus, en particulier des acides nucléiques codant pour une enzyme participant à la voie de biosynthèse  
25 d'antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactames, les aminoglycosides, les nucléotides hétérocycliques ou encore des polykétides ainsi que l'enzyme codée par ces acides nucléiques, les polykétides produits grâce à l'expression de ces acides nucléiques et enfin des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité pharmacologiquement active  
30 d'un polykétide produit grâce à l'expression de tels acides nucléiques.

Depuis la découverte de la production de la streptomycine par les actinomycètes, la recherche de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique, et tout particulièrement de nouveaux antibiotiques, a eu recours de manière accrue à des méthodes de criblage des métabolites  
35 produits par les micro-organismes du sol.

De telles méthodes consistent principalement à isoler les organismes de la microflore tellurique, à les cultiver sur des milieux nutritifs spécialement adaptés puis à détecter une activité pharmacologique dans les produits retrouvés dans les surnageants de culture ou dans les lysats cellulaires ayant, le cas échéant, subi au préalable une ou plusieurs étapes de séparation et/ou de purification.

Ainsi, les méthodes d'isolement et de culture in vitro des organismes constituant la microflore tellurique ont permis, à la date d'aujourd'hui, de caractériser environ 40.000 molécules, dont environ la moitié présente une activité biologique.

Des produits majeurs ont été caractérisés selon de telles méthodes de culture in vitro, tels que des antibiotiques (pénicilline, érythromycine, actinomycine, tétracycline, céphalosporine), des anticancéreux, des anticholestérolémiants ou encore des pesticides.

Les produits d'intérêt thérapeutique d'origine microbienne connus à ce jour proviennent majoritairement (environ 70%) du groupe des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces*. Toutefois, d'autres composés thérapeutiques, tels que les teicoplanines, la gentamycine et les spinosines, ont été isolés à partir de microorganismes de genres plus difficiles à cultiver tels que *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Kitasatosporia* ou encore *Saccharomonospora*.

Mais la pratique illustre le fait que la caractérisation de nouveaux produits naturels synthétisés par les organismes de la microflore du sol est restée limitée, en partie du fait que l'étape de culture in vitro aboutit le plus souvent à une sélection d'organismes déjà connus antérieurement.

Les méthodes de séparation et de culture in vitro des organismes telluriques en vue d'identifier de nouveaux composés d'intérêt présentent donc de nombreuses limites.

Chez les actinomycètes, par exemple, le taux de redécouverte d'antibiotiques déjà connus antérieurement est d'environ 99%. En effet, des techniques de microscopie en fluorescence ont permis de dénombrier plus de  $10^{10}$  cellules bactériennes dans 1g de sol, alors que



seulement 0,1 à 1% de ces bactéries peuvent être isolées après ensemencement sur des milieux de culture.

A l'aide de techniques de cinétique de réassociation d'ADN, il a pu être montré qu'entre 12.000 et 18.000 espèces bactériennes peuvent  
5 être contenues dans 1g de sol, alors qu'à ce jour, seuls 5000 micro-organismes non eucaryotes ont été décrits, tout habitat confondu.

Dés études d'écologie moléculaire ont permis d'amplifier et cloner de nombreuses séquences nouvelles d'ADNr 16S à partir d'ADN de l'environnement.

10 Les résultats de ces études ont conduit à tripler le nombre de divisions bactériennes caractérisées antérieurement.

A la date d'aujourd'hui, les bactéries sont subdivisées en 40 divisions, certaines d'entre elles n'étant constituées que par des bactéries ne pouvant être cultivées. Ces derniers résultats témoignent de  
15 l'ampleur de la biodiversité microbienne restée inexploitée à ce jour.

Des travaux récents ont tenté de surmonter les nombreux obstacles à l'accès à la biodiversité de la microflore du sol, dont notamment l'étape de culture in vitro préalable à l'isolement et la caractérisation de composés d'intérêt industriel, surtout d'intérêt  
20 thérapeutique.

Des méthodes ont ainsi été mises au point qui incluent une étape d'extraction de l'ADN des organismes telluriques, le cas échéant après un isolement préalable des organismes contenus dans les échantillons de sol.

25 L'ADN ainsi extrait, après lyse des cellules bactériennes sans étape préalable de culture in vitro, est cloné dans des vecteurs utilisés pour transférer des organismes hôtes, afin de constituer des banques d'ADN provenant de bactéries du sol.

Ces banques de clones recombinants sont utilisées pour  
30 détecter la présence de gènes codant pour des composés d'intérêt thérapeutique ou alternativement pour détecter la production de composés d'intérêt thérapeutique par ces clones recombinants.

Toutefois, les méthodes d'accès direct à l'ADN de la microflore du sol, décrites dans l'état de la technique présentent des inconvénients  
35 lors de la mise en oeuvre de chacune des étapes décrites ci-dessus, de

nature à affecter considérablement la quantité et la qualité du matériel génétique obtenu et exploitable.

L'état de la technique concernant chacune des étapes de construction de banques d'ADN provenant d'échantillons de sol est détaillé ci-après, ainsi que les inconvénients techniques identifiés par le demandeur et qui ont été surmontés selon la présente invention.

## **1. Etape d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon du sol.**

### **1.1 Extraction directe d'ADN de l'environnement.**

Il s'agit pour l'essentiel d'un procédé mettant en oeuvre des techniques d'extraction d'ADN réalisées directement sur l'échantillon dans l'environnement, le plus souvent après une lyse in situ préalable des organismes de l'échantillon.

De telles techniques ont été mises en oeuvre sur des échantillons provenant de milieux aquatiques, que ce soit d'eau douce ou marine. Elles comprennent une première étape de concentration préalable des cellules présentes librement ou sous forme de particules, consistant en général en une filtration de grands volumes d'eau sur différents dispositifs de filtration, par exemple filtration classique sur membrane, filtration tangentielle ou rotationnelle ou encore ultrafiltration.

La taille des pores est comprise entre 0,22 et 0,45 mm et nécessite souvent une préfiltration dans le but d'éviter des colmatages dus au traitement de grands volumes.

Dans un second temps, les cellules récoltées sont lysées directement sur les filtres dans des petits volumes de solutions, par traitement enzymatique et/ou chimique.

Cette technique est par exemple illustrée par les travaux de STEIN et al. , 1996, Journal of Bacteriology, Vol.178 (3): 591-599 qui décrit le clonage de gènes codant pour de l'ADN ribosomal et pour un facteur d'élongation de la transcription (EF 2) à partir d'*Archaeobactéries* du plancton marin.

Des techniques d'extraction directe d'ADN à partir d'échantillons de sol ou de sédiment ont été également décrites, basées sur des protocoles de lyse physique, chimique ou enzymatique réalisée in situ.

5 Par exemple, le brevet US N°5,824,485 (Chromaxome Corporation) décrit une lyse chimique des bactéries directement sur l'échantillon prélevé par addition d'un tampon de lyse chaud à base d'isothiocyanate de guanidium.

La demande Internationale n°WO 99/20.799 (WISCONSIN  
10 ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) décrit une étape de lyse des bactéries in situ à l'aide d'un tampon d'extraction contenant une protéase et du SDS.

D'autres techniques ont également été utilisées telles que la réalisation de plusieurs cycles de congélation-décongélation de  
15 l'échantillon puis pressage de l'échantillon décongelé à haute pression. Ont été également utilisées des techniques de lyse des bactéries à l'aide d'une succession d'étapes de sonication, de chauffage par micro-ondes et de chocs thermiques (PICARD et al. (1992).

Toutefois, les techniques d'extraction directe d'ADN de l'état de  
20 la technique décrites ci-dessus ont une efficacité très variable du point de vue quantitatif et qualitatif.

Ainsi, les traitements chimiques ou enzymatiques in situ de l'échantillon ont le désavantage de ne lyser que certaines catégories de micro-organismes du fait de la résistance sélective des différents micro-  
25 organismes indigènes à l'étape de lyse en raison de leur morphologie hétérogène.

Ainsi, les bactéries à Gram-positif résistent à un traitement à chaud au détergent SDS alors que la quasi-totalité des cellules à Gram-négatif sont lysées .

30 En outre, certains des protocoles d'extraction directe décrits ci-dessus favorisent l'adsorption des acides nucléiques extraits sur les particules minérales de l'échantillon, réduisant ainsi significativement la quantité d'ADN accessible.

Par ailleurs, si certains protocoles de l'état de la technique  
35 divulguent une étape de traitement mécanique pour lyser les micro-

organismes de l'échantillon prélevé, une telle étape de lyse mécanique est systématiquement effectuée en milieu liquide dans un tampon d'extraction, ce qui ne permet pas une bonne homogénéisation de l'échantillon de départ sous la forme de particules fines permettant une  
5 accessibilité maximale à la diversité des organismes présents dans l'échantillon. Des essais de broyage ont également été effectués sur échantillon de sol brut à l'aide de billes de verre, mais la quantité d'ADN extrait était faible.

Il a été observé selon l'invention qu'une première étape de lyse  
10 mécanique in situ en milieu liquide avait des effets négatifs sur la quantité d'ADN susceptible d'être extrait.

La quantité d'ADN directement utilisable pour le clonage dans des vecteurs recombinants est également tributaire des étapes de purification subséquentes à son extraction.

15 Dans l'état de la technique, l'ADN extrait est ensuite purifié, par exemple par l'utilisation de polyvinylpolypyrrolidone, par une précipitation en présence d'acétate d'ammonium ou de potassium, par des centrifugations sur gradient de chlorure de césium, ou encore des techniques chromatographiques, notamment sur support  
20 d'hydroxyapatite, sur colonne échangeuse d'ions ou encore tamisage moléculaire ou par des techniques d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Les techniques de purification d'ADN décrites antérieurement, surtout lorsque celles-ci sont combinées avec les techniques d'extraction d'ADN de l'environnement précitées, sont susceptibles de conduire à  
25 une co-purification de l'ADN avec des composés inhibiteurs provenant de l'échantillon initial qui sont difficiles à éliminer.

La co-extraction de composés inhibiteurs avec l'ADN nécessite la multiplication du nombre d'étapes de purification ce qui conduit à des pertes importantes de l'ADN initialement extrait et réduit simultanément  
30 la diversité du matériel génétique initialement contenu dans l'échantillon, ainsi que sa quantité.

Un autre but de l'invention a été de surmonter les inconvénients des protocoles de purification antérieurs et de mettre au point une étape de purification d'ADN permettant de maintenir de manière optimale la

diversité de l'ADN de l'échantillon initial, d'une part, et, de favoriser quantitativement son obtention, d'autre part.

Tout particulièrement, les améliorations qualitatives et quantitatives à la purification d'ADN sont maximales lorsqu'elles font appel à une combinaison d'un procédé d'extraction direct de l'ADN selon l'invention et d'un procédé de purification ultérieur, comme cela sera décrit ci-après.

### **1.2. Extraction indirecte d'ADN de l'environnement.**

10

De telles techniques ont recours à une première étape de séparation des différents organismes de la microflore tellurique des autres constituants de l'échantillon de départ, préalablement à l'étape d'extraction de l'ADN proprement dite.

15

Dans l'état de la technique, la séparation préalable d'une fraction microbienne d'un échantillon de sol comprend le plus souvent une dispersion physique de l'échantillon par broyage de ce dernier en milieu liquide, par exemple en utilisant des dispositifs du type Waring Blender ou encore un mortier.

20

Il a également été décrit des dispersions chimiques, par exemple sur des résines échangeuses d'ions ou encore des dispersions à l'aide de détergents non spécifiques tels que le déoxycholate de sodium ou du polyéthylène glycol. Quel que soit le mode de dispersion, l'échantillon solide doit être mis en suspension dans de l'eau, du tampon phosphate ou une solution saline.

25

L'étape de dispersion physique ou chimique peut être suivie d'une centrifugation sur gradient de densité permettant la séparation des cellules contenues dans l'échantillon et des particules de ce dernier, étant entendu que les bactéries ont des densités inférieures à celles de la plupart des particules du sol.

30

L'étape de dispersion physique peut aussi être suivie alternativement d'une étape de centrifugation à faible vitesse ou encore une étape d'élutriation cellulaire.

L'ADN peut ensuite être extrait des cellules séparées par toutes les méthodes de lyse disponibles et être purifié par de nombreuses

35

méthodes, y compris les méthodes de purification décrites au paragraphe 1.1 précédent. Notamment, l'inclusion des cellules dans de l'agarose à bas point de fusion peut être réalisée afin de ménager la lyse.

5           Toutefois, les méthodes décrites dans l'état de la technique connues du demandeur ne donnent pas satisfaction du fait de la présence, dans les fractions contenant l'ADN extrait, de constituants indésirables de l'échantillon de départ ayant une influence significative sur la qualité et la quantité d'ADN final.

10           La présente invention se propose de résoudre les difficultés techniques rencontrées dans les procédés de l'art antérieur comme cela sera décrit ci-après.

## **2. Caractérisation moléculaire de l'ADN extrait.**

15           Lorsque l'on désire construire une banque d'ADN à partir d'un échantillon de l'environnement, en particulier à partir d'un échantillon de sol, il est avantageux de vérifier la qualité et la diversité de la source d'ADN extrait et purifié préalablement à son insertion dans des vecteurs  
20 appropriés.

          L'objectif d'une telle caractérisation moléculaire de l'ADN extrait et purifié est d'obtenir des profils représentant les proportions des différents taxons bactériens présents dans cet extrait d'ADN. La caractérisation moléculaire de l'ADN extrait et purifié permet de  
25 déterminer si des artéfacts ont été introduits lors de la mise en oeuvre des différentes étapes d'extraction et de purification et, le cas échéant, si la diversité d'origine de l'ADN extrait et purifié est représentative de la diversité microbienne présente initialement dans l'échantillon, notamment dans l'échantillon de sol.

30           A la connaissance du demandeur, il est recouru dans l'état de la technique à des procédés d'hybridation quantitative mettant en oeuvre des sondes oligonucléotidiques spécifiques de différents groupes bactériens, appliqués directement à l'ADN extrait de l'environnement.

Malheureusement, une telle approche est peu sensible et ne permet pas de détecter des genres ou des groupes taxonomiques présents en faible abondance.

5 L'état de la technique décrit aussi des procédés de PCR quantitative, telle que la MPN-PCR ou encore la PCR quantitative par compétition. Toutefois, ces techniques présentent d'importants inconvénients.

Ainsi, la MPN-PCR est d'une utilisation complexe du fait de la multiplication des dilutions et des répétitions qui la rend inappropriée  
10 pour un grand nombre d'échantillons ou de couples d'amorces.

Par ailleurs, la PCR quantitative par compétition est d'une mise en oeuvre difficile du fait de la nécessité de construire un compétiteur spécifique à l'ADN cible qui, en outre, n'induit pas de biais ou d'artéfacts dans la compétition proprement dite.

15 Il est ainsi proposé selon l'invention un procédé de précriblage d'une banque d'ADN provenant d'un échantillon de l'environnement qui est à la fois rapide, simple et fiable et permet de tester la qualité de l'ADN préalablement extrait et purifié et de déterminer ainsi l'intérêt de construire une banque de clones préparés à partir de cet ADN purifié de  
20 départ.

### **3. Vecteurs pour le clonage de l'ADN extrait et purifié à partir d'un échantillon de l'environnement.**

25 De nombreux vecteurs ont déjà été décrits dans l'état de la technique afin de cloner de l'ADN préalablement extrait d'un échantillon de l'environnement.

Ainsi, selon la description de la demande internationale n°WO 99/20.799, peuvent être utilisés des vecteurs viraux, des phages, des plasmides, des phagemides, des cosmides, des phosmides, des  
30 vecteurs du type BAC (chromosome artificiel bactérien) ou encore le bactériophage P1, des vecteurs de type PAC (chromosome artificiel basé sur le bactériophage P1), des vecteurs du type YAC (chromosome artificiel de levure), des plasmides de levure ou tout autre vecteur

capable de maintenir et d'exprimer de manière stable un ADN génomique.

L'exemple 1 de la demande PCT n°WO 99/20.799 décrit la construction d'une banque d'ADN génomique par clonage dans un vecteur du type BAC.

A la connaissance du demandeur, aucune banque d'ADN provenant d'un échantillon de l'environnement n'avait encore été effectivement réalisée avec des vecteurs de type conjugatif, une telle technique étant rendue pour la première fois accessible et reproductible par l'homme du métier grâce à l'enseignement de la présente invention.

#### **4. Hôtes cellulaires**

Dans l'état de la technique, de nombreuses cellules hôtes ont été décrites comme pouvant être utilisées afin d'héberger les vecteurs contenant les inserts d'ADN provenant de l'ADN extrait et purifié à partir d'un échantillon de l'environnement.

Ainsi, la demande PCT N°WO 99/20.799 cite de nombreux hôtes cellulaires appropriés, tels que *Escherichia coli*, en particulier la souche DH 10B ou encore la souche 294 (ATCC 31446, la souche *E. coli* B, *E. Coli* X 1776 (ATCC N°31.537), *E.coli* DH5  $\alpha$  et *E.coli* W3110 (ATCC n°27.325).

Cette demande PCT cite également d'autres cellules hôtes appropriées telles que *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Schigella* ou encore des souches du type bacillus telles que *B. subtilis* et *B. licheniformis* ainsi que les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Streptomyces* ou *Actinomyces*.

Le brevet US N°5,824,485 cite en particulier la souche de *Streptomyces lividans* TK66 ou encore des cellules de levure telles que celles de *Saccharomyces pombe*.

#### **5. Caractérisation de gènes d'intérêt dans des banques d'ADN provenant d'un échantillon de l'environnement.**



La demande PCT N° WO 99/20.799 décrit une identification du phénotype de différents clones appartenant à la banque d'ADN de *B.cereus*, respectivement un clone produisant de l'hémolysine, un clone hydrolysant l'esculine ou encore un clone produisant un pigment orange.

5 Des techniques de mutagenèse basées sur l'utilisation d'un transposon codant pour l'enzyme pho A ont permis subséquemment d'isoler des clones mutés et de caractériser les séquences responsables des phénotypes observés.

10 L'article de STEIN et al. (1996) précité décrit l'utilisation d'amorces spécifiques de l'ADN ribosomal afin d'amplifier l'ADN inséré dans les vecteurs hébergés par certains clones d'une banque d'ADN génomique d'Archaeobactéries de plancton marin et l'identification de plusieurs séquences codantes dans l'ADN ainsi amplifié.

15 L'article de BORSCHERT S. et al., (1992) décrit le criblage d'une banque d'ADN génomique de *Bacillus subtilis* à l'aide de couples d'amorces hybridant avec des régions conservées de peptide synthétases connues afin d'identifier un ou plusieurs gènes correspondant dans le génome de *Bacillus subtilis*.

20 Cette technique a permis de détecter un fragment d'ADN chromosomique d'environ 26 kb portant une partie de l'opéron de biosynthèse de la surfactine.

L'article de KAH-TONG S. et al.(1997) décrit le criblage d'une banque d'ADN provenant du sol à l'aide d'amorces hybridant avec des séquences conservées de l'opéron responsable de la voie de biosynthèse des polykétides de type II et montre l'identification, au sein de cette banque d'ADN, de séquences apparentées au gène PKS- $\beta$ . Cet article décrit aussi la construction de cassettes d'expression hybrides dans lesquelles la séquence de la sous-unité PKS- $\beta$ , retrouvée naturellement dans l'opéron responsable de la biosynthèse des polykétides, a été remplacée par différentes séquences apparentées retrouvées dans la banque d'ADN.

35 De même, l'article de HONG-FU et al. , (1995) décrit la construction de cassettes d'expression contenant les différentes phases de lecture ouverte de l'opéron responsable de la biosynthèse des polykétides, les différentes cassettes d'expression ayant été construites

artificiellement en combinant les phases de lecture ouverte qui ne sont pas retrouvées ensemble naturellement dans le génome de *Streptomyces coelicolor*. Cet article montre que la combinaison, dans les cassettes d'expression artificielles, de cadres de lecture ouvert  
5 originaux de différentes souches bactériennes permet la production de polykétides ayant différentes caractéristiques structurales et des activités antibiotiques plus ou moins grandes vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

Les polykétides font partie d'une grande famille de produits  
10 naturels de structure variable et possédant une grande diversité d'activités biologiques. Font partie des polykétides par exemple, les tétracyclines et l'érythromycine (antibiotiques), le FK506 (immunosuppresseur), la doxorubicine (agent anti-cancéreux), la monensine (un agent coccidiostatique) ainsi que l'ivermectine (un agent  
15 antiparasitaire).

Ces molécules sont synthétisées grâce à des enzymes multifonctionnelles appelées polykétides synthases, qui catalysent des cycles de condensation répétés entre des acyl thioesters (en général des acétyl, propionyl, malonyl ou méthylmalonyl thioesters). Chaque cycle de  
20 condensation aboutit à la formation, sur une chaîne croissante carbonée, d'un groupe  $\beta$ -céto qui peut ensuite subir, le cas échéant, une ou plusieurs séries d'étapes réductrices.

Compte-tenu de l'intérêt clinique important des polykétides, leur mécanisme commun de biosynthèse ainsi que le haut degré de  
25 conservation observé entre les groupes de gènes codant pour les polykétides synthases, il s'est développé un intérêt accru pour le développement de nouveaux polykétides par génie génétique.

De nouveaux polykétides artificiels ont ainsi été produits par génie génétique, tels que la méderrhodine A ou la dihydrogranatirhodine.  
30 La grande majorité des molécules nouvelles de polykétides obtenues par génie génétique sont très différentes, du point de vue structural, des polykétides correspondants naturels.

De l'état de la technique, il ressort ainsi qu'il existe un besoin d'obtention de nouveaux polykétides d'intérêt et tout particulièrement de  
35 polykétides d'intérêt thérapeutique présentant notamment, par rapport à

leurs homologues naturels, un niveau accru d'activité antibiotique ou encore un spectre d'activité antibiotique différent, soit plus large que celui des polykétides connus, soit au contraire plus sélectif.

5 Ce besoin est, comme cela sera décrit ci-après, en partie comblé selon la présente invention.

### **DESCRIPTION DE L'INVENTION**

10 L'invention concerne tout d'abord un procédé pour la construction de banques d'ADN provenant d'un échantillon de l'environnement, un tel échantillon pouvant être indifféremment un milieu aquatique (eau douce ou marine), un échantillon de sol (couche superficielle du sol, sous-sol ou sédiments), ou encore un échantillon d'organismes eucaryotes contenant une microflore associée, tel que par  
15 exemple un échantillon provenant de plantes, d'insectes ou encore d'organismes marins et possédant une microflore associée.

La mise au point d'un procédé de construction d'une banque d'ADN d'un échantillon de l'environnement, et tout particulièrement d'un échantillon de sol, comprend des étapes critiques dont la mise en oeuvre  
20 doit être nécessairement optimisée pour l'obtention d'une banque d'ADN dont le contenu en acides nucléiques d'intérêt répond aux objectifs initialement fixés.

Une première étape critique consiste en l'extraction et la purification ultérieure des acides nucléiques contenus initialement dans l'échantillon, c'est-à-dire principalement des acides nucléiques contenus  
25 dans les divers organismes composant la microflore de cet échantillon.

La qualité de la purification de l'ADN extrait est déterminante sur le résultat obtenu.

Une seconde étape importante d'un procédé de construction d'une banque d'acides nucléiques provenant d'un échantillon de l'environnement est l'évaluation de la diversité génétique des acides nucléiques extraits et purifiés. La mise au point d'une étape de réalisation simple et fiable de pré-criblage de l'ADN extrait et purifié afin de vérifier qu'il rend compte, au moins partiellement, de la diversité  
30 phylogénétique des organismes présents initialement dans l'échantillon  
35

de départ, permet en effet de déterminer l'intérêt ou non d'utiliser la source initiale d'ADN extrait et purifié pour la construction de la banque d'acides nucléiques proprement dite ou au contraire de ne pas poursuivre la construction de la banque d'acides nucléiques du fait d'artéfacts trop importants introduits au moment de l'extraction et de la purification des acides nucléiques. Il a en outre été identifié selon l'invention que la qualité des inserts introduits dans les vecteurs pour construire la banque est déterminante. Il a ainsi été déterminé que l'utilisation d'enzymes de restriction pour cliver l'ADN extrait et purifié à partir de l'échantillon de l'environnement était de nature à introduire des artéfacts ou "biais" dans la structure des inserts obtenus. En effet, l'ADN extrait du sol ou d'autres environnements, provenant en très grande majorité d'organismes non cultivables, est composé de molécules dont le taux de bases G et C est par définition inconnu et de plus variable en fonction de l'origine de ces organismes.

Une troisième étape critique est l'insertion des acides nucléiques extraits et purifiés dans des vecteurs capables d'intégrer des acides nucléiques de longueur choisie, d'une part, et, d'autre part, d'en permettre la transfection ou encore l'intégration dans le génome dans des hôtes cellulaires déterminés ainsi que, le cas échéant, d'en permettre l'expression dans de tels hôtes cellulaires.

Constituent des vecteurs d'intérêt, les vecteurs capables d'intégrer des acides nucléiques de grande taille, c'est-à-dire de taille supérieure à 100 kb lorsque l'objectif poursuivi consiste en un clonage et en une identification d'un opéron complet capable de diriger une voie complète de biosynthèse d'un composé d'intérêt industriel, en particulier d'un composé d'intérêt pharmaceutique ou agronomique.

## DEFINITIONS

30

Au sens de la présente invention, on entend par "acides nucléiques", "polynucléotides" et "oligonucléotides" aussi bien des séquences d'ADN, d'ARN, que des séquences hybrides ARN/ADN de plus de 2 nucléotides, indifféremment sous la forme simple brin ou double brin.

35

Le terme " banque " ou " collection " est utilisé dans la présente description en référence indifféremment à un ensemble d'acides nucléiques extraits et, le cas échéant purifiés, provenant d'un échantillon de l'environnement, à un ensemble de vecteurs recombinants, chacun des vecteurs recombinants de l'ensemble comprenant un acide nucléique provenant de l'ensemble d'acides nucléiques extraits et, le cas échéant purifiés précités, ainsi qu'à un ensemble de cellules hôtes recombinantes comprenant un ou plusieurs acides nucléiques provenant de l'ensemble des acides nucléiques extraits et, le cas échéant, purifiés précités, lesdits acides nucléiques étant soient portés par un ou plusieurs vecteurs recombinants, soit intégrés dans le génome desdites cellules hôtes recombinantes.

On désigne par " échantillon de l'environnement " indifféremment un échantillon d'origine aquatique, par exemple d'eau douce ou saline, ou un échantillon tellurique provenant de la couche superficielle d'un sol, de sédiments ou encore de couches inférieures du sol (sous-sol), ainsi que des échantillons d'organismes eucaryotes, le cas échéant multicellulaires, d'origine végétale, provenant d'organismes marins ou encore d'insectes et possédant une microflore associée, cette microflore associée constituant des organismes d'intérêt.

On entend par " opéron " selon l'invention, un ensemble de cadres ouverts de lecture dont la transcription et/ou la traduction est co-régulée par un ensemble unique de signaux de régulation de la transcription et/ou de la traduction. Selon l'invention, un opéron peut également comprendre lesdits signaux de régulation de la transcription et/ou de la traduction.

Par " voie métabolique " aux fins de l'invention ou encore " voie de biosynthèse " on entend un ensemble de réactions biochimiques anaboliques ou cataboliques réalisant la conversion d'une première espèce chimique en une seconde espèce chimique.

Par exemple, une voie de biosynthèse d'un antibiotique est constituée de l'ensemble des réactions biochimiques convertissant des métabolites primaires en produits intermédiaires des antibiotiques, puis subséquentement en antibiotiques.

Par séquence de régulation placée "en phase" (en anglais operably linked) par rapport à une séquence nucléotidique dont l'expression est recherchée, on signifie que la ou les séquences de régulation de la transcription sont localisées, par rapport à la séquence nucléotidique d'intérêt dont l'expression est recherchée, de manière à permettre l'expression de ladite séquence d'intérêt, la régulation de la dite expression étant dépendante de facteurs interagissant avec les séquences nucléotidiques régulatrices.

Selon une autre terminologie, on peut dire également que la séquence nucléotidique d'intérêt dont l'expression est recherchée est placée "sous le contrôle" des séquences nucléotidiques régulatrices de la transcription.

Le terme "isolé" au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement).

Par exemple, un polynucléotide ou un polypeptide présent à l'état naturel dans un organisme (virus, bactérie, champignon, levure, plante ou animal) n'est pas isolé. Le même polypeptide séparé de son environnement naturel ou le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de l'organisme, est isolé.

Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeure néanmoins à l'état isolé, du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Le terme "purifié" ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusif de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polypeptide ou un polynucléotide est à l'état purifié après purification du matériel de départ d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

Le "pourcentage d'identité" entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptide dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des "gaps") par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auquel une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de Mars 1996, BLAST 2.0.4. de Février 1998 et BLAST 2.0.6. de Septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut (S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990 215: 403-410, S. F. Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997 25: 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence "requête" de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

## **EXTRACTION ET PURIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES PROVENANT D'UN ECHANTILLON DE L'ENVIRONNEMENT.**

### **1. Extraction directe d'acides nucléiques**

Il a été montré selon la présente invention que, pour l'obtention d'une banque d'acides nucléiques provenant d'organismes contenus

dans un échantillon du sol, il était important de créer des conditions dans lesquelles, d'une part, les différents organismes de l'échantillon sont rendus accessibles aux étapes ultérieures d'extraction des acides nucléiques et, d'autre part, que l'étape initiale de traitement de l'échantillon de sol permette une lyse mécanique maximale des organismes de l'échantillon de nature à rendre directement accessibles les acides nucléiques de ces organismes, principalement l'ADN génomique et plasmidique, aux tampons utilisés pour les étapes ultérieures d'extraction.

Il a été ainsi démontré selon l'invention qu'une accessibilité maximale des acides nucléiques provenant des micro-organismes d'un échantillon du sol était atteinte par un broyage poussé et à sec de l'échantillon de sol préalablement séché afin d'obtenir des micro-particules. Le demandeur a ainsi déterminé que le séchage de l'échantillon de sol préalable à tout traitement ultérieur provoque une diminution significative de la cohésion de l'échantillon de sol brut et favorise en conséquence sa désagrégation ultérieure sous la forme de micro-particules, lorsqu'un traitement par broyage approprié est opéré.

De manière surprenante, le demandeur a montré que des micro-particules d'échantillons de sol sec réunissaient des propriétés physico-chimiques favorables à l'extraction d'une quantité optimale d'acides nucléiques qui, dans leur nature, pouvaient être représentatifs de la diversité génétique des organismes présents initialement dans l'échantillon de sol de départ. Il a été montré en particulier que le procédé d'extraction directe d'acides nucléiques selon l'invention permettait l'extraction d'ADN provenant de micro-organismes rares, tels certains *Streptomyces* rares ou des micro-organismes sporulés.

Par "micro-particules" de l'échantillon de sol aux fins de la présente invention, on entend des particules dérivées de l'échantillon ayant une taille moyenne d'environ 50  $\mu\text{m}$ , c'est à dire comprise en moyenne entre 45 et 55  $\mu\text{m}$ .

Selon l'invention, les micro-particules sont obtenues à partir d'échantillons de sol préalablement séchés ou dessiqués puis broyés jusqu'à l'obtention de micro-particules de taille moyenne comprise entre



2µm et 50µm, avant remise en suspension dans un milieu tampon liquide des micro-particules obtenus.

Un tel milieu tampon liquide peut consister en un tampon d'extraction d'acides nucléiques, en particulier un tampon d'extraction d'ADN conventionnel bien connu de l'homme du métier.

Le broyage de l'échantillon de sol en micro-particules a pour double fonction de lyser mécaniquement la majorité des organismes présents dans l'échantillon de sol initial et de rendre accessibles les organismes non lysés par ce traitement mécanique à des étapes facultatives ultérieures de lyse chimique et/ou enzymatique.

Ainsi, un premier objet de l'invention consiste en un procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes, ledit procédé comprenant une première étape (I-(a)) d'obtention de micro-particules par broyage de l'échantillon de sol préalablement séché ou dessiqué, puis mise en suspension des micro-particules dans un milieu tampon liquide.

De manière tout à fait préférée, l'étape de broyage est réalisée à l'aide d'un dispositif à billes d'agate ou de tungstène ou encore à l'aide d'un dispositif à anneaux de tungstène. Ces dispositifs sont préférés car la dureté de matériaux comme l'agate ou le tungstène facilite significativement l'obtention des micro-particules de la taille spécifiée ci-dessus. Pour cette raison, on ne choisira pas préférentiellement, voire on évitera, un recours à un dispositif de broyage à billes de verre, qui s'est révélé beaucoup moins efficace.

Le séchage ou la classification de l'échantillon de sol peut-être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier. Par exemple, l'échantillon de sol brut peut être séché à température ambiante pendant une durée de 24 à 48 heures.

Comme indiqué précédemment, le milieu tampon liquide peut consister en un milieu d'extraction de l'ADN présent dans les micro-particules. On utilisera de manière tout à fait préférée un tampon d'extraction désigné TENP contenant respectivement 50 mM tris, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl et 1% (poids/volume) de polyvinylpolypyrrolidone, à pH 9,0.

Le procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol est en outre caractérisé en ce que l'étape d'obtention de micro-particules par broyage de l'échantillon de sol préalablement séché ou dessiqué est suivie d'une étape I-(b) d'extraction des acides nucléiques présents dans les micro-particules.

Il est constant que l'extraction des acides nucléiques est accompagnée d'une co-extraction de composés et/ou de constituants du sol indésirables nécessitant la purification ultérieure des acides nucléiques extraits, une telle étape de purification ultérieure devant être à la fois suffisamment sélective pour permettre l'élimination des composés et/ou constituants du sol indésirables et d'un rendement suffisant pour entraîner une perte faible en quantité de l'ADN préalablement extrait.

Il a été montré selon l'invention qu'une étape de purification de l'ADN extrait des micro-particules de l'échantillon de sol répondant aux critères de sélectivité et de rendement définis ci-dessus, comprend un traitement de l'ADN extrait par une combinaison de deux étapes successives de chromatographie, respectivement une chromatographie sur tamis moléculaire et une chromatographie d'échange d'anions.

Selon une autre caractéristique du procédé ci-dessus, l'étape I-(b) d'extraction des acides nucléiques est suivie d'une étape I-(c) de purification des acides nucléiques extraits à l'aide des deux étapes de chromatographie suivantes:

- passage de la solution contenant les acides nucléiques sur un tamis moléculaire, puis récupération des fractions d'élution enrichies en acides nucléiques;
- passage des fractions d'élution enrichies en acides nucléiques sur un support de chromatographie d'échange d'anions, puis récupération des fractions d'élution contenant les acides nucléiques.

La nature et l'ordre des étapes de chromatographie ci-dessus sont essentiels à une bonne sélectivité et un excellent rendement de

l'étape de purification de l'ADN préalablement extrait des micro-particules de l'échantillon du sol préalablement séché ou dessiqué.

De manière très avantageuse, le support chromatographique du type " tamis moléculaire " de l'étape de purification d'acides nucléiques ci-dessus consiste en un support chromatographique de type Sephacryl® S400 HR ou un support chromatographique de caractéristiques équivalentes.

De manière tout à fait préférée, le support chromatographique d'échange d'anions utilisé lors de la seconde étape de purification de l'ADN extrait est un support de type Elutip® d, ou un support chromatographique de caractéristiques équivalentes.

En combinant les étapes I-(a) d'obtention de micro-particules de l'échantillon de sol sec, I-(b) d'extraction des acides nucléiques présents dans les micro-particules et I-(c) de purification par les étapes chromatographiques décrites ci-dessus, il a été possible selon l'invention d'extraire directement l'ADN du sol sans purification préalable des cellules des organismes contenus initialement dans l'échantillon, tout en évitant la co-extraction de contaminants du sol, tels que par exemple les acides humiques qui est observée avec les procédés de l'état de la technique.

Les contaminants, tels que les acides humiques affectent sévèrement les analyses et les utilisations subséquentes des acides nucléiques dont la purification est recherchée.

Selon le procédé ci-dessus, il est en outre possible d'accéder aux acides nucléiques contenus dans les organismes qui n'ont pas été lysés mécaniquement au cours de l'étape I-(a) d'obtention de micro-particules de l'échantillon de sol, dans le but d'obtenir une collection quasi-exhaustive de la diversité génétique des acides nucléiques présents initialement dans l'échantillon de sol. Ainsi, les micro-particules de l'échantillon de sol peuvent faire l'objet d'étapes ultérieures de traitement de lyse chimique, enzymatique ou physique, ou encore d'une combinaison de traitements chimiques, enzymatiques ou physiques.

Selon un premier aspect, le procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol selon

l'invention, peut être en outre caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie des étapes suivantes:

- traitement de la suspension de sol dans un milieu tampon  
5 liquide par sonication;
- extraction et récupération des acides nucléiques.

De manière préférée, on aura recours, pour un traitement par  
10 sonication, à un dispositif de type à micro-pointe en titane, tel que le dispositif 600 W Vibracell Ultrasonicator commercialisé par la Société Bioblock ou encore un sonicateur de type Cup Horn.

De manière tout à fait préférée, l'étape de sonication est  
réalisée à une puissance de 15 W pendant une durée de 7 à 10 min et  
15 comprend des cycles successifs de sonication, la sonication proprement dite étant réalisée pendant 50% de la durée de chaque cycle.

Selon un second aspect, le procédé ci-dessus peut être en  
outre caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie des étapes suivantes:

- 20 • traitement de la suspension de sol dans un milieu tampon liquide par sonication;
- incubation de la suspension à 37°C après sonication en présence de lysozyme et d'achromopeptidase;
- 25 • addition de SDS avant centrifugation et précipitation des acides nucléiques;
- récupération des acides nucléiques précipités.
- 30

De préférence, l'étape d'incubation en présence de lysozyme et d'achromopeptidase sera réalisée à une concentration finale de 0,3 mg/ml de chacune des deux enzymes, préférentiellement pendant 30 minutes à 37°C.

De manière préférée, le SDS sera utilisé à une concentration finale de 1% et pendant un temps d'incubation de 1 heure à la température de 60°C avant centrifugation et précipitation.

Selon un troisième aspect, le procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol ci-dessus est en outre caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie des étapes suivantes:

- homogénéisation de la suspension de sol avec une étape de mixage violent (vortex) suivie d'une étape de simple agitation;
- congélation de la suspension homogène suivie d'une décongélation ;
- traitement par sonication de la suspension après décongélation;
- incubation de la suspension à 37°C après sonication en présence de lysozyme et d'achromopeptidase;
- addition de SDS avant centrifugation et précipitation des acides nucléiques;
- récupération des acides nucléiques.

De manière préférée, les suspensions de micro-particules de sol sont passées au vortex puis homogénéisées par une agitation douce sur un agitateur à rotation circulaire pendant une durée de deux heures avant d'être congelées à -20°C.

Préférentiellement, les suspensions sont à nouveau agitées violemment par vortex pendant 10 minutes, après décongélation et avant l'étape de sonication.

Il va sans dire que les acides nucléiques extraits par les modes de réalisation du procédé d'extraction directe d'acides nucléiques décrit ci-dessus sont préférentiellement purifiés selon l'étape de purification constituée d'un premier passage sur tamis moléculaire puis un passage subséquent des fractions d'élution obtenues à l'issue de la chromatographie sur tamis moléculaire sur un support chromatographique d'échange d'anions.

## 2. Extraction indirecte des acides nucléiques

Selon un second mode de réalisation du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, selon l'invention, ledit échantillon de l'environnement subit un premier traitement de nature à permettre la séparation des organismes, contenus dans cet échantillon, des autres macro-constituants de l'échantillon.

Ce second mode de réalisation du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention favorise l'obtention d'acides nucléiques de grande taille, qui sont pratiquement impossibles à obtenir selon le premier mode de réalisation du procédé selon l'invention décrit ci-dessus, l'étape de lyse mécanique opérée pour l'obtention des micro-particules ayant également pour effet de casser physiquement les acides nucléiques de l'échantillon de sol ou des acides nucléiques contenus dans les organismes de l'échantillon de sol.

L'obtention d'acides nucléiques de grande taille a été recherchée par le demandeur dans le but d'isoler et de caractériser les acides nucléiques comprenant, au moins partiellement, l'ensemble des séquences codantes appartenant à un même opéron capable de diriger la biosynthèse d'un composé d'intérêt industriel.

De manière préférée, on obtient, en mettant en oeuvre le second mode de réalisation du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol selon l'invention, des acides nucléiques ayant une taille supérieure à 100 kb, de préférence supérieure à 200, 250 ou 300 kb, et de manière tout à fait préférée d'acides nucléiques d'une taille supérieure à 400, 500 ou encore 600 kb.

Ce second mode de réalisation d'un procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement selon l'invention est constitué d'une combinaison de quatre étapes successives destinées à l'obtention des acides nucléiques ayant les caractéristiques décrites ci-dessus.

Lorsque l'échantillon de l'environnement est un échantillon de sol, il a été montré selon l'invention qu'une première étape d'obtention d'une suspension par dispersion de l'échantillon de sol en milieu liquide

favorisait l'accessibilité des organismes contenus dans l'échantillon sans provoquer de lyse mécanique significative des cellules.

La première étape d'obtention d'une dispersion de l'échantillon de sol ci-dessus rend accessibles les organismes de l'échantillon au milieu extérieur et permet également une dissociation partielle des organismes de l'échantillon et des macro-constituants. Elle rend ainsi possible une séparation ultérieure des organismes contenus initialement dans l'échantillon des autres constituants de ce dernier.

Lorsque l'échantillon de l'environnement provient par exemple de végétaux, d'organismes marins ou d'insectes, un traitement préalable par broyage est nécessaire afin de rendre les organismes de la microflore associée accessible aux étapes ultérieures du procédé.

Ainsi, le présent procédé comprend une étape de séparation des organismes des autres constituants minéraux et/ou organiques obtenus précédemment par une centrifugation sur un gradient de densité. Les organismes ainsi séparés sont ensuite soumis à une étape de lyse puis d'extraction des acides nucléiques.

L'étape de centrifugation sur un gradient de densité a, de manière surprenante, permis de séparer les cellules d'organismes des particules de sol contenues dans la suspension de l'échantillon. On aurait en effet pu s'attendre à ce qu'une proportion des cellules soient entraînées avec les macro-particules au sein de la phase de gradient. En outre, il n'avait jamais été démontré jusqu'à présent qu'une centrifugation sur gradient de densité d'un échantillon de sol permettait de retrouver, à l'interface phase aqueuse/gradient, une population d'organismes représentative de la diversité des organismes présents dans l'échantillon de départ, du fait que ces organismes sont de volume, densité et forme extrêmement variables. On pouvait raisonnablement supposer qu'ils seraient retrouvés indifféremment au sein de la phase aqueuse, à l'interface phase aqueuse/gradient de densité et également au sein du gradient de densité lui-même.

Ainsi, l'homme du métier pouvait s'attendre à ce que des organismes présentant des densités plus faibles ou plus grandes que la densité du gradient de densité utilisé (densité du gradient de densité

comprise entre 1,2 et 1,5 g/ml , préférentiellement 1,3 g/ml) ne pouvait être récupérés, ce qui aurait eu pour effet d'introduire un biais dans la représentativité des organismes effectivement séparés et, par voie de conséquence, également dans la diversité des acides nucléiques extraits.

En outre, dans un mode de réalisation particulier du procédé, une étape de germination des spores, en particulier d'actinomycètes, est réalisée, ce qui a pour effet d'accroître de manière significative la quantité d'ADN d'actinomycètes récupérée.

La dernière étape consiste en une étape de purification des acides nucléiques ainsi extraits sur un gradient de chlorure de césium.

De manière surprenante, la purification des acides nucléiques sur le gradient de chlorure de césium permet une élimination substantielle, voire complète, des substances composant le gradient de densité. Cette caractéristique est déterminante en ce qui concerne l'utilisation ultérieure des acides nucléiques purifiés car le gradient de densité est connu comme un puissant inhibiteur enzymatique, capable le cas échéant d'inhiber l'activité catalytique des enzymes utilisées pour préparer l'insertion des acides nucléiques extraits dans des vecteurs.

Selon ce second mode de réalisation, le procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement contenant des organismes selon l'invention comprend la succession d'étapes suivantes:

(i) obtention d'une suspension par dispersion de l'échantillon de l'environnement en milieu liquide puis homogénéisation de la suspension obtenue par agitation douce;

(ii) séparation des organismes des autres constituants minéraux et/ou organiques de la suspension homogène obtenue à l'étape (i) par centrifugation sur un gradient de densité;

(iii) lyse des microorganismes séparés à l'étape (ii) et extraction des acides nucléiques ;



(iv) purification des acides nucléiques sur un gradient de chlorure de césium .

Préférentiellement, la suspension de l'échantillon de sol est  
5 obtenue par dispersion de cet échantillon par broyage à l'aide d'un  
dispositif de type Waring Blender ou un dispositif de caractéristiques  
équivalentes. De manière tout à fait préférée, la suspension d'échantillon  
est obtenue après trois broyages successifs d'une durée d'une minute  
chacun dans un dispositif de type Waring Blender. De préférence,  
10 l'échantillon broyé sera refroidi dans la glace entre chacun des broyages.

De manière préférée, les organismes sont ensuite séparés des  
particules du sol par centrifugation sur un coussin de densité du type  
" Nycodenz ", commercialisé par la Société Nycomed Pharma AS. (Oslo  
, Norvège). Les conditions préférées de centrifugation sont de 10.000g  
15 pendant 40 minutes à 4°C, avantageusement dans un rotor à godets  
mobiles du type " rotor TST 28.38 " commercialisé par la Société  
KONTRON.

L'anneau d'organismes localisé, après centrifugation, à  
l'interphase de la phase supérieure aqueuse et de la phase inférieure de  
20 Nycodenz est alors prélevé et lavé par centrifugation avant reprise du  
culot cellulaire dans un tampon approprié.

L'étape (iii) de lyse des organismes séparés à l'étape (ii) décrite  
ci-dessus peut être réalisée de toute manière connue de l'homme du  
métier.

25 Avantageusement, les cellules sont lysées dans une solution  
Tris 10 mM-EDTA 100mM à pH 8.0 en présence de lysozyme et  
d'achromopeptidase, avantageusement pendant une heure à 37°C.

L'extraction proprement dite de l'ADN peut être  
avantageusement réalisée par addition d'une solution de lauryl sarcosyl  
30 (1% du poids final de la solution) en présence de protéinase K et  
incubation de la solution finale à 37°C pendant 30 minutes.

Les acides nucléiques extraits à l'étape (iii) sont ensuite purifiés  
sur un gradient de chlorure de césium. Préférentiellement, l'étape de  
purification des acides nucléiques sur un gradient de chlorure de césium

est réalisée par centrifugation à 35.000 tours/minute pendant 36 heures, par exemple sur un rotor du type Kontron 65.13.

Selon un aspect particulier du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes selon l'invention, lesdits acides nucléiques sont constitués majoritairement, sinon exclusivement, de molécules d'ADN.

Selon un autre aspect, les acides nucléiques peuvent être récupérés après inclusion des organismes, séparés sur un gradient de densité, dans un bloc d'agarose et lyse, par exemple chimique et/ou enzymatique, des organismes inclus dans le bloc d'agarose.

Un autre objet de l'invention consiste en une collection d'acides nucléiques constitués des acides nucléiques obtenus à l'étape II-(iv) du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention ou encore obtenue à l'étape (c) ou une étape ultérieure du procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention.

L'invention est encore relative à un acide nucléique caractérisé en ce qu'il est contenu dans une collection d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus.

Selon un premier aspect, un tel acide nucléique constitutif d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant au moins un opéron, ou une partie d'un opéron.

De manière tout à fait préférée, un tel opéron code pour la totalité ou une partie d'une voie métabolique.

L'exemple 9 décrit la construction d'une banque d'ADN génomique à partir d'une souche de *Streptomyces alboniger* et son clonage respectivement dans les cosmides navettes pOS700I et pOS700R. Il a été montré selon l'invention que dans la banque d'ADN réalisée dans le vecteur intégratif pOS700I neuf clones contiennent des séquences nucléotidiques appartenant à l'opéron responsable de la voie de biosynthèse de la puromycine. De même, il a pu être identifié au sein de la banque d'ADN réalisée dans le vecteur réplcatif pOS 700R douze

clones contenant des séquences nucléotidiques de l'opéron responsable de la voie de biosynthèse de la puromycine.

En particulier, certains cosmides intégratifs et replicatifs des banques réalisées présentent, après digestion par les endonucléases de restriction Clal et EcoRV, un fragment d'une taille de 12 kb susceptible  
5 de contenir la totalité des séquences de l'opéron responsable de la voie de biosynthèse de la puromycine.

Ainsi, selon un autre aspect, un acide nucléique selon l'invention contient, au moins en partie, des séquences nucléotidiques de  
10 l'opéron responsable de la voie de biosynthèse de la puromycine.

L'exemple 2 ci-après décrit la construction d'une banque d'ADN selon un procédé conforme à la présente invention dans un vecteur pBluescript SK<sup>-</sup> à partir d'un sol contaminé par du lindane.

Les vecteurs recombinants ont été transfectés dans des  
15 cellules d'*Escherichia coli* DH10B puis les cellules transformées ont été cultivées dans un milieu de culture approprié en présence de lindane. Un criblage des clones de cellules transformées de la banque a permis de montrer que, sur 10.000 clones criblés, 35 d'entre eux présentaient un phénotype de dégradation du lindane. La présence du gène linA chez  
20 ces clones a pu être confirmée par amplification PCR grâce à des amorces spécifiques de ce gène.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention concerne également un acide nucléique contenant une séquence nucléotidique de la voie métabolique provoquant la biodégradation du lindane.

Il est donc clairement démontré, comme décrit plus haut, qu'un  
25 procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes selon l'invention ainsi qu'un procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants contenant les acides nucléiques constitutifs de la collection d'acides  
30 nucléiques précités était tout à fait apte à l'isolement et à la caractérisation de séquences nucléotidiques incluses dans un opéron.

Une démonstration supplémentaire de l'aptitude d'un procédé selon l'invention à l'identification de séquences nucléotidiques codantes impliquées dans une voie de biosynthèse régulée sous la forme d'un  
35 opéron est en outre décrite plus loin: il s'agit du clonage et de la

caractérisation de séquences codant pour des polykétides synthases impliquées dans la voie de biosynthèse des polykétides, qui appartiennent à une famille de molécules dont certains représentants sont d'un intérêt thérapeutique majeur, en particulier antibiotique.

5 La présente invention a donc en outre pour objet un acide nucléique constitutif d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la totalité d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide.

Selon un premier aspect, un acide nucléique constitutif d'une  
10 collection d'acides nucléiques selon l'invention est d'origine procaryote.

Selon un second aspect, un acide nucléique constitutif d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention provient d'une bactérie ou d'un virus.

Selon un troisième aspect, un acide nucléique constitutif d'une  
15 collection d'acides nucléiques selon l'invention est d'origine eucaryote.

En particulier, un tel acide nucléique est caractérisé en ce qu'il provient d'un champignon, d'une levure, d'une plante ou d'un animal.

#### 20 CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA COLLECTION D'ACIDES NUCLEIQUES EXTRAITS DU SOL.

Afin de surmonter les nombreux inconvénients techniques des méthodes de caractérisation des banques d'ADN extraits et purifiés à partir d'un échantillon de l'environnement qui ont été décrits dans la  
25 partie de la description relative à l'état de la technique, le demandeur a mis au point un procédé simple et fiable permettant de caractériser qualitativement et semi-quantitativement les acides nucléiques obtenus à l'issue du procédé décrit ci-dessus.

Le procédé selon l'invention consiste ainsi à amplifier  
30 universellement un fragment de 700 pb localisé à l'intérieur d'une séquence d'ADN ribosomal de type 16 S, puis d'hybrider l'ADN amplifié avec une sonde oligonucléotidique de spécificité variable et enfin de comparer l'intensité d'hybridation de l'échantillon par rapport à une gamme étalon externe d'ADN de séquence ou d'origine connue.

L'amplification préalable à l'hybridation avec la sonde oligonucléotidique permet de quantifier des genres ou des espèces de micro-organismes peu abondants. De plus, l'amplification par des amorces universelles permet, lors de l'hybridation, d'utiliser une large  
5 série de sondes oligonucléotidiques.

Ainsi, l'invention a en outre pour objet un procédé de détermination de la diversité des acides nucléiques contenus dans une collection d'acides nucléiques, et tout particulièrement d'une collection d'acides nucléiques provenant d'un échantillon de l'environnement,  
10 préférentiellement d'un échantillon du sol, ledit procédé comprenant les étapes suivantes:

- mise en contact des acides nucléiques de la collection d'acides nucléiques à tester avec un couple d'amorces  
15 oligonucléotidiques hybridant à toute séquence d'ADN ribosomal 16 S bactérien;

- réalisation d'au moins trois cycles d'amplification ;
- détection des acides nucléiques amplifiés à l'aide d'une sonde oligonucléotidique ou d'une pluralité de sondes oligonucléotidiques,  
20 chaque sonde hybridant spécifiquement avec une séquence d'ADN ribosomal 16 S commune à un règne, un ordre, une sous-classe ou un genre bactérien;

- le cas échéant, comparaison des résultats de l'étape de détection précédente avec les résultats de détection, à l'aide de la sonde  
25 ou de la pluralité de sondes d'acides nucléiques de séquence connue constituant une gamme étalon.

De manière préférée, un premier couple d'amorces hybridant avec des régions universellement conservées du gène de l'ARN ribosomal 16 S est constitué respectivement des amorces FGPS 612  
30 (SEQ ID N°12) et FGPS 669 (SEQ ID N°13).

Un second mode de réalisation d'un couple d'amorces préféré selon l'invention est constitué du couple d'amorces universelles 63 f (SEQ ID N°22) et 1387r (SEQ ID N°23).

Selon un mode particulier de réalisation d'un procédé de  
35 détermination de la diversité des acides nucléiques d'une collection

d'acides nucléiques, l'étape d'amplification à l'aide d'un couple d'amorces universelles peut être réalisée sur une collection de vecteurs recombinants dans chacun desquels a été inséré un acide nucléique de la collection d'acides nucléiques considérée, préalablement à l'étape d'hybridation avec les sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un règne, d'un ordre, d'une sous-classe ou d'un genre bactérien particulier.

Un tel procédé de détermination de la diversité des acides nucléiques contenus dans une collection est tout particulièrement applicable aux collections d'acides nucléiques obtenus conformément à l'enseignement de la présente description.

Ainsi, l'exemple 3 détaille un procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes comprenant une étape d'extraction indirecte d'ADN par dispersion d'un échantillon du sol préalablement à la séparation des cellules sur gradient de Nycodenz, lyse des cellules puis purification de l'ADN sur gradient de chlorure de césium.

La collection d'acides nucléiques ainsi obtenue a été utilisée telle quelle ou sous la forme d'inserts dans des vecteurs de type cosmide dans un procédé d'amplification à l'aide des amorces universelles de l'ADNr 16 S précitées, puis les ADN amplifiés ont été soumis à une étape de détection à l'aide de sondes oligonucléotidiques de séquences SEQ ID N°14 à SEQ ID N°21 qui sont présentées dans le tableau 4.

Les résultats montrent qu'un procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes selon l'invention permet d'accéder à l'ADN de plus de 14% de la microflore tellurique totale, soit  $2 \times 10^8$  cellules par gramme de sol, alors que la microflore totale cultivable ne représente qu'à peine 2% de la population microbienne totale.

Afin de déterminer la diversité phylogénétique d'une collection d'acides nucléiques préparés conformément à l'invention, 47 séquences du gène ARNr 16S ont été isolées et séquencées. Ces séquences correspondent respectivement aux séquences nucléotidiques SEQ ID N°60 à SEQ ID N°106.

Les acides nucléiques comprenant les séquences SEQ ID N° 60 à SEQ ID N° 106 font également partie de l'invention, ainsi que les acides nucléiques possédant au moins 99 %, préférentiellement 99,5% ou 99,8% d'identité en acides nucléiques avec les acides nucléiques comprenant les séquences SEQ ID N° 60 à SEQ ID N° 106. De telles séquences peuvent être utilisées notamment en tant que sondes pour cribler des clones d'une banque d'ADN et identifier ainsi ceux, parmi les clones de la banque, qui contiennent de telles séquences, ces séquences étant susceptibles d'être à proximité de séquences codantes d'intérêt, telles que des séquences codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de métabolites antibiotiques, par exemple des polykétides.

La comparaison des séquences d'ARNr 16S à partir d'une banque d'ADN réalisée conformément à l'invention avec les séquences répertoriées dans la base données RDP (Maidak B.L., Cole J.R., Parker C.T., Garrity G.M., Larsen N., Li B., Lilburn T.G., McCaughey, M.J., Olsen G.J., Overbeek R., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M., Woese C.R. (1999) "A new projet of the RDP (Ribosomal Database Project)" Nucleic Acids Research Vol. 27: 171-173) ont permis de déterminer que les acides nucléiques contenus dans une collection d'acides nucléiques selon l'invention proviennent d' $\alpha$ -protéobactéries, de  $\beta$ -protéobactéries, de  $\delta$ -protéobactéries, de  $\gamma$ -protéobactéries, d'actinomycètes ainsi que d'un genre apparenté à acidobactérium. Ces résultats, présentés dans le tableau 7 ainsi que par l'arbre phylogénétique de la figure 7 rendent compte de la grande diversité phylogénétique des acides nucléiques contenus dans une banque d'ADN préparée conformément au procédé selon l'invention.

### VECTEURS DE CLONAGE ET/OU D'EXPRESSION

30

Chacun des acides nucléiques contenus dans une collection d'acides nucléiques préparés conformément à l'invention peut être inséré dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

A cette fin, tous types de vecteurs connus de l'état de la technique peuvent être utilisés, tels que des vecteurs viraux, des

phages, des plasmides, des phagemides, des cosmides, des phosmides, des vecteurs de type BAC, des bactériophages P1, des vecteurs de type BAC, des vecteurs de type YAC, des plasmides de levure ou encore tout autre vecteur connu de l'état de la technique par l'homme du métier.

On aura avantageusement recours selon l'invention à des vecteurs permettant une expression stable des acides nucléiques d'une banque d'ADN. A cette fin, de tels vecteurs incluent préférentiellement des séquences de régulation de la transcription qui sont localisées en phase ("operably linked") avec l'insert génomique de manière à permettre l'initiation et/ou la régulation de l'expression d'au moins une partie dudit insert d'ADN.

Il résulte de ce qui précède, que l'invention concerne encore un procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants caractérisé en ce que les acides nucléiques obtenus à l'étape II-(iv) ou à l'étape I-(c) ou toute autre étape ultérieure d'un procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes selon l'invention sont insérés dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

Préalablement à leur insertion dans un vecteur de clonage et/ou d'expression, les acides nucléiques constitutifs d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention peuvent être séparés en fonction de leur taille, par exemple par électrophorèse sur un gel d'agarose, le cas échéant après digestion à l'aide d'une endonucléase de restriction.

Selon un autre aspect, la taille moyenne des acides nucléiques constitutifs d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention peut être rendue d'une taille sensiblement uniforme par la mise en oeuvre d'une étape de rupture physique préalablement à leur insertion dans le vecteur de clonage et/ou d'expression.

Une telle étape de rupture physique ou mécanique des acides nucléiques peut consister en des passages successifs de ces derniers, en solution, dans un canal métallique d'environ 0,4 mm de diamètre, par exemple le canal d'une aiguille de seringue ayant un tel diamètre.

La taille moyenne des acides nucléiques peut dans ce cas être comprise entre 30 et 40 kb de longueur.



La construction des vecteurs préférés selon l'invention est schématisée dans les figures 25 (cosmide intégratif conjugatif) et 26 (BAC intégratif).

Des vecteurs de clonage et/ou d'expression pouvant être  
5 avantageusement utilisés aux fins d'insertion des acides nucléiques, contenus dans une collection ou banque d'ADN selon l'invention sont notamment les vecteurs décrits dans le brevet européen N°EP-0 350 341 et dans le brevet US N°5 688 689, de tels vecteurs étant spécialement adaptés à la transformation de souches d'actinomycètes.  
10 De tels vecteurs contiennent, outre une séquence d'ADN de l'insert, une séquence d'attachement att ainsi qu'une séquence d'ADN codant pour une intégrase (séquence int) fonctionnelle dans les souches d'actinomycètes.

Toutefois, il a été observé selon l'invention que certains  
15 vecteurs de clonage et/ou d'expression présentaient des inconvénients et que leur capacité fonctionnelle théorique n'était pas atteinte dans la pratique.

Ainsi, il est apparu que le système d'intégration contenu dans des vecteurs de l'état de la technique, et notamment dans les vecteurs  
20 décrits dans le brevet européen n°EP 0 350 41 ne permettait pas en réalité une bonne intégration de l'insert d'ADN de la banque au sein du chromosome bactérien.

Partant de l'hypothèse que les déficits fonctionnels d'intégration  
25 de tels vecteurs au sein du chromosome bactérien étaient dus à un défaut dans l'expression du gène de l'intégrase présent dans ces vecteurs, le demandeur a tout d'abord cherché à augmenter l'expression du gène de l'intégrase en substituant au promoteur de la transcription initial un promoteur de la transcription susceptible d'augmenter  
30 significativement le nombre de transcrits de l'intégrase.

Les résultats ont été décevants et la fonction d'intégration au chromosome de ces vecteurs n'a pas été améliorée.

De manière surprenante, il a été montré selon l'invention que les difficultés d'expression de l'intégrase contenues dans cette famille de

vecteurs intégratifs ne se situait pas au niveau de la quantité d'expression des transcrits, mais au niveau de leur stabilité.

Selon une seconde hypothèse, le demandeur a pu montrer que le défaut de stabilité des transcrits de l'intégrase était causé par des  
5 déficits dans la terminaison de la transcription de l'ARN messager correspondant.

Le demandeur a alors inséré un site terminateur placé en aval de la séquence codant pour l'intégrase du vecteur de manière à obtenir un ARN messager de taille déterminée. L'insertion d'un signal de  
10 terminaison additionnel en aval de la séquence nucléotidique codant pour l'intégrase du vecteur a permis l'obtention d'une famille de vecteurs intégratifs de type cosmide et de type BAC .

Préférentiellement, le site terminateur est placé en aval du site d'attachement att.

15

En outre, le demandeur a mis au point de nouveaux vecteurs conjugatifs et de nouveaux vecteurs réplicatifs du type cosmide et de nouveaux vecteurs conjugatifs de type BAC qui peuvent  
20 avantageusement être utilisés pour l'insertion des acides nucléiques constitutifs d'une collection d'acides nucléiques préparés selon le procédé de l'invention.

Lorsque l'insertion de fragments d'ADN de taille moyenne est recherchée, on utilise préférentiellement des vecteurs du type cosmide, capables de recevoir des inserts ayant une taille maximale d'environ 50  
25 kb.

De tels vecteurs cosmidiques sont tout particulièrement adaptés pour l'insertion d'acides nucléiques constitutifs d'une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé de l'invention comprenant une première étape d'extraction directe d'ADN par lyse mécanique des  
30 organismes contenus dans l'échantillon de sol initial.

Lorsque l'insertion d'acides nucléiques de grande taille, en particulier d'acides nucléiques d'une taille supérieure à 100 kb, voire supérieure à 200, 300, 400, 500 ou 600 kb est recherchée, on aura alors recours préférentiellement à des vecteurs du type BAC capables de  
35 recevoir des inserts d'ADN d'une telle taille.

De tels vecteurs de type BAC sont tout particulièrement adaptés pour l'insertion des acides nucléiques constitutifs d'une collection d'acides nucléiques obtenus conformément au procédé selon l'invention dans lequel la première étape est constituée d'une extraction  
5 indirecte de l'ADN par séparation préalable des organismes contenus dans l'échantillon de sol initial et élimination des macro-constituants dudit échantillon de sol.

En particulier, des vecteurs du type BAC sont avantageusement mis en oeuvre pour l'insertion d'acides nucléiques de grande taille  
10 contenant, au moins partiellement, la séquence nucléotidique d'un opéron.

Ainsi, le procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression selon l'invention est en outre caractérisé en ce que le vecteur de clonage et/ou d'expression est  
15 du type plasmide.

Selon un autre aspect, un tel procédé est caractérisé en ce que le vecteur de clonage et/ou d'expression est du type cosmide.

Selon un premier aspect, il peut s'agir d'un cosmide répliatif chez *E.coli* et intégratif chez *Streptomyces*. Un vecteur cosmidique tout à fait préféré répondant à une telle définition est le cosmide pOS7001  
20 décrit à l'exemple 3.

Selon encore un autre aspect, le vecteur cosmidique est conjugatif et intégratif chez *Streptomyces*.

De manière générale, des vecteurs conjugatifs de type cosmide  
25 ou de type BAC, qui comprennent dans leurs séquences nucléotidiques un motif reconnu par la machinerie enzymatique cellulaire appelé "origine de conjugaison" sont utilisés chaque fois que l'on veut éviter un recours à des techniques de transformation lourdes et peu automatisables.

Par exemple, la transfection de vecteurs initialement hébergés par des cellules de *E.coli* dans des cellules de *Streptomyces* nécessite classiquement une étape de récupération du vecteur recombinant contenu dans les cellules de *Escherichia coli*, et sa purification préalable à l'étape de transformation de protoplastes de *Streptomyces*. Il est  
35 communément admis qu'une transfection d'un ensemble de 1000 clones

de *Escherichia coli* dans *Streptomyces* requiert l'obtention d'environ 8000 clones pour que chaque clone de *E. coli* ait une chance d'être représenté.

5 A l'inverse, une étape de transfection par conjugaison d'un vecteur hébergé par *E.coli* vers des cellules de *Streptomyces* nécessite le même nombre de clones de chacun des micro-organismes, l'étape de conjugaison ayant lieu " clone à clone " et ne comprenant en outre pas les difficultés techniques liées à l'étape de transfert de matériel génétique par transformation de protoplastes, par exemple en présence  
10 de polyéthylène glycol.

Afin d'optimiser la construction de banque d'ADN chez *Streptomyces*, il a été mis au point selon l'invention, de nouveaux vecteurs conjuguatifs de type cosmide et de type BAC de nature à permettre une efficacité maximale de l'étape de conjugaison.

15 Notamment, les nouveaux vecteurs conjuguatifs selon l'invention ont été construits en plaçant un gène marqueur de sélection à l'extrémité de l'ADN du vecteur qui est transféré à la bactérie réceptrice en dernier lieu. Ce perfectionnement aux vecteurs conjuguatifs de l'état de la technique permet de ne sélectionner positivement que les bactéries  
20 réceptrices ayant reçu la totalité de l'ADN du vecteur et, en conséquence, la totalité de l'ADN de l'insert d'intérêt.

Des cosmides conjuguatifs et intégratifs chez *Streptomyces* préférés selon l'invention sont les cosmides pOSV303, pOSV306 et pOSV307 décrits à l'exemple 5.

25 Selon un autre aspect, un procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants selon l'invention est mis en oeuvre à l'aide d'un cosmide réplcatif à la fois chez *E.coli* et chez *Streptomyces*. Un tel cosmide est avantageusement le cosmide pOS 700R décrit à l'exemple 6.

30 Selon encore un autre aspect, le procédé ci-dessus peut être mis en oeuvre avec un cosmide réplcatif chez *E. coli* et *Streptomyces* et conjuguatif chez *Streptomyces*.

Un tel cosmide réplcatif et conjuguatif peut être obtenu à partir d'un cosmide réplcatif conforme à l'invention, par l'insertion d'une

origine de transfert appropriée, telle que RK2, comme décrit à l'exemple 5 pour la construction du vecteur pOSV303.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants selon l'invention, on a recours à un vecteur de clonage et/ou d'expression de type BAC.

Selon un premier aspect, le vecteur du type BAC est intégratif et conjugatif chez *Streptomyces*.

De manière tout à fait préférée, un tel vecteur BAC intégratif et conjugatif chez *Streptomyces* est le vecteur BAC pOSV 403 décrit à l'exemple 8, ou encore les vecteurs BAC pMBD-1, pMBD-2, pMBD-3, pMBD-4, pMBD-5 et pMBD-6 décrits à l'exemple 15.

L'invention a en outre pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs recombinants suivants:

a) un vecteur comprenant un acide nucléique constitutif d'une collection d'acides nucléiques selon l'invention;

b) un vecteur tel qu'obtenu selon un procédé éliminant tout recours à l'action d'une endonucléase de restriction sur le fragment d'ADN à insérer, tel que décrit précédemment.

De manière tout à fait préférée, l'invention est également relative à un vecteur choisi parmi les vecteurs suivants:

- le cosmide pOS700I;
- le cosmide pOSV303;
- le cosmide pOSV306;
- le cosmide pOSV307;
- le cosmide pOS700R;
- le vecteur BAC pOSV403;
- le vecteur BAC pMBD-1;
- le vecteur BAC pMBD-2;
- le vecteur BAC pMBD-3;
- le vecteur BAC pMBD-4;
- le vecteur BAC pMBD-5;
- le vecteur BAC pMBD-6.

L'invention est en outre relative à une collection de vecteurs recombinants tels qu'obtenus selon l'un quelconque des procédés selon l'invention.

5    **Procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression selon l'invention.**

Les techniques conventionnelles d'insertion d'ADN au sein d'un vecteur afin de préparer un vecteur de clonage et/ou d'expression  
10 recombinant font classiquement appel à une première étape au cours de laquelle une endonucléase de restriction est incubée à la fois avec l'ADN à insérer et avec le vecteur récepteur créant ainsi des extrémités compatibles entre l'ADN à insérer et l'ADN du vecteur permettant l'assemblage des deux ADN avant une étape de ligation finale  
15 permettant l'obtention du vecteur recombinant.

Toutefois, une telle technique conventionnelle présente des inconvénients notables, tout particulièrement lorsque est recherchée l'insertion d'acides nucléiques de grande taille dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

20    En effet, l'action préalable d'une enzyme de restriction sur les fragments d'ADN destinés à être insérés dans un vecteur est susceptible de réduire notablement la taille de cet ADN préalablement à son insertion dans le vecteur. Il va sans dire qu'une réduction significative de la taille de l'ADN préalablement à son insertion sur un vecteur est une  
25 situation particulièrement défavorable lorsqu'est recherché le clonage de fragments d'ADN de grande taille susceptible de contenir l'ensemble des séquences codantes et, le cas échéant, également des séquences régulatrices, d'un opéron dont l'expression constitue une voie de biosynthèse complète d'un métabolite d'intérêt industriel, et tout  
30 particulièrement d'un composé d'intérêt thérapeutique.

Pour remédier aux inconvénients des techniques de l'art antérieur, il a été mis au point selon l'invention deux procédés de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression qui ne nécessitent pas le recours à une endonucléase de restriction sur  
35 l'ADN à insérer préalablement à son introduction au sein du vecteur. De

tels procédés sont en conséquence tout à fait adaptés au clonage de longs fragments d'ADN susceptibles de contenir, au moins partiellement, l'ensemble des séquences codantes et, le cas échéant, également des séquences régulatrices, d'un opéron complet responsable d'une voie de biosynthèse.

5

Selon un premier aspect, un procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression selon l'invention est caractérisé en ce que l'insertion d'un acide nucléique dans le vecteur de clonage et/ou d'expression, comprend les étapes suivantes:

10

- ouvrir le vecteur de clonage et/ou d'expression à un site de clonage choisi, à l'aide d'une endonucléase de restriction appropriée;

15

- ajouter un premier acide nucléique homopolymérique à l'extrémité 3' libre du vecteur ouvert;

20

- ajouter un second acide nucléique homopolymérique, de séquence complémentaire au premier acide nucléique homopolymérique, à l'extrémité 3' libre de l'acide nucléique à insérer dans le vecteur;

25

- assembler l'acide nucléique du vecteur et l'acide nucléique par hybridation du premier et du second acide nucléique homopolymérique de séquences complémentaires l'une de l'autre;

30

- refermer le vecteur par ligation.

Un tel procédé est décrit aux exemples 10 et 13 ci-après.

De manière avantageuse, le procédé ci-dessus peut comporter les caractéristiques suivantes, isolément ou en combinaison:

30

- le premier acide nucléique homopolymérique est de séquence poly(A) ou poly(T);

- le second acide nucléique homopolymérique est de séquence poly(T) ou poly(A).

De manière tout à fait préférée, les acides nucléiques homopolymériques ont une longueur comprise entre 25 et 100 bases nucléotidiques, préférentiellement entre 25 et 70 bases nucléotidiques.

Le procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression décrit ci-dessus est particulièrement adapté à la construction de banques d'ADN dans des vecteurs de type BAC. Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation d'un vecteur recombinant décrit ci-dessus, ledit procédé est en outre caractérisé en ce que la taille de l'acide nucléique à insérer est d'au moins 100 kb, et préférentiellement d'au moins 200, 300, 400, 500 ou 600 kb.

Un tel procédé de préparation est donc particulièrement adapté à l'insertion des acides nucléiques contenus dans une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé de l'invention.

Afin de permettre l'insertion de fragments d'ADN de grande taille dans des vecteurs de clonage et/ou d'expression, il a été mis au point selon l'invention, un second procédé ayant permis d'éliminer tout recours à l'action d'une endonucléase de restriction sur l'ADN destiné à être inséré au sein du vecteur.

Un tel procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression selon l'invention est caractérisé en ce que l'étape d'insertion d'un acide nucléique dans ledit vecteur de clonage et/ou d'expression comprend les étapes suivantes:

- création de bouts francs sur les extrémités de l'acide nucléique de la collection par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes;

- ouverture du vecteur de clonage et/ou d'expression à un site de clonage choisi à l'aide d'une endonucléase de restriction appropriée;

- addition d'adaptateurs oligonucléotidiques complémentaires ;



- création de bouts francs aux extrémités de l'acide nucléique du vecteur par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes, puis déphosphorylation des extrémités 5' afin de prévenir une recircularisation du vecteur;

- insertion de l'acide nucléique de la collection dans le vecteur par ligation.

De manière préférée, l'élimination des séquences 3' sortantes est réalisée à l'aide d'une exonucléase, telle que l'enzyme de Klenow.

De manière préférée, le remplissage des séquences 5' sortantes est réalisé à l'aide d'une polymérase, et de manière tout à fait préférée de la T4 polymérase, en présence des quatre nucléotides triphosphates.

Un procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes tel que décrit ci-dessus est particulièrement adapté à la construction de banques d'ADN à partir de vecteurs de type cosmide.

Un tel procédé d'obtention de vecteurs recombinants est décrit à l'exemple 12.

Dans un mode particulier de préparation d'un vecteur recombinant selon l'invention, des oligonucléotides comprenant un ou plusieurs sites de restriction rares sont ajoutés sur le vecteur au niveau du site de clonage de l'ADN à insérer, conformément à l'enseignement de l'exemple 10. Cet ajout d'oligonucléotides facilite la récupération ultérieure des inserts sans clivage de ces derniers.

### CELLULES HOTES

Bien que tout type de cellules hôtes puisse être utilisé pour la transfection ou la transformation avec un acide nucléique ou un vecteur recombinant selon l'invention, notamment une cellule hôte procaryote ou eucaryote, on utilisera de préférence des cellules hôtes dont les

caractères physiologiques, biochimiques et génétiques sont bien caractérisés, facilement cultivables à grande échelle et dont les conditions de culture pour la production de métabolites soient bien connues.

5 De manière préférentielle, la cellule hôte réceptrice d'un acide nucléique ou d'un vecteur recombinant selon l'invention est phylogénétiquement proche des organismes donneurs contenus initialement dans l'échantillon de l'environnement desquels les acides nucléiques sont originaires.

10 De manière tout à fait préférée, une cellule hôte selon l'invention doit posséder un usage des codons similaire, ou du moins proche, des organismes donneurs présents initialement dans l'échantillon de l'environnement, tout particulièrement de l'échantillon de sol.

15 La taille des fragments d'ADN susceptible de porter les séquences nucléotidiques d'intérêt recherchées peut être variable. Ainsi, des enzymes codées par des gènes de taille moyenne de 1 kb pourront être exprimées à partir d'inserts de petite taille alors que l'expression de métabolites secondaires nécessiteront le maintien dans l'organisme hôte de fragments de taille bien supérieure, par exemple de 40 kb à plus de 20 100 kb, 200 kb, 300 kb, 400 kb ou 600 kb.

Ainsi, les cellules hôtes de *Escherichia coli* constituent un choix privilégié pour le clonage de grands fragments d'ADN.

25 De manière tout à fait préférée, on aura recours à l'utilisation de la souche de *Escherichia coli* désignée DH10B et décrite par Shizuya et al; (1992) pour laquelle des protocoles de clonage dans des vecteurs BAC ont été optimisés.

30 Toutefois, d'autres souches de *Escherichia coli* peuvent être avantageusement utilisées pour la construction d'une banque d'ADN selon l'invention, telles que les souches *E.coli* Sure, *E.coli* DH5  $\alpha$ , ou encore *E.coli* 294 (ATCC N°31446).

En outre, la construction d'une banque d'ADN par transfection de cellules de *E.coli* avec des vecteurs recombinants selon l'invention est également possible, l'expression de gènes de divers procaryotes tels

que *Bacillus*, *Thermotoga*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* ou *Clostridium* ayant été décrite dans la demande PCT N°WO 99/20799.

De manière générale, des cellules hôtes de *E.coli* peuvent dans  
5 tous les cas constituer des hôtes transitoires dans lesquels des vecteurs recombinants selon l'invention pourront être maintenus avec une grande efficacité, le matériel génétique pouvant être facilement manipulé et archivé et façon stable.

Dans le but d'exprimer la plus grande diversité moléculaire  
10 possible, d'autres hôtes cellulaires pourront être également avantageusement mis en oeuvre tels que des cellules de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Myxococcus*, *Aspergillus nidulans* ou encore *Neurospora crassa*.

Il a en outre été montré selon la présente invention, que des  
15 cellules de *Streptomyces lividans* peuvent être utilisées avec succès et constituent des systèmes d'expression complémentaires à *Escherichia coli*.

*Streptomyces lividans* constitue un modèle pour l'étude de la génétique des *Streptomyces* et a également été utilisé comme hôte d'expression  
20 hétérologue de nombreux métabolites secondaires. *Streptomyces lividans*, possède en commun avec d'autres actinomycètes tels que *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces fradiae*, ainsi que *Streptomyces griseochromogenes*, les molécules précurseurs et les systèmes de régulation nécessaires à l'expression de tout ou  
25 partie des voies de biosynthèses complexes, telles que par exemple la voie de biosynthèse des polykétides ou encore la voie de biosynthèse des polypeptides non ribosomiques représentant des classes de molécules de structures très diverses.

*Streptomyces lividans* présente également l'avantage  
30 d'accepter l'ADN étranger avec des efficacités de transformation élevées.

Ainsi, l'invention concerne aussi une cellule hôte recombinante comprenant un acide nucléique selon l'invention, constitutif d'une collection d'acides nucléiques préparée selon un procédé conforme à

l'invention, ou encore une cellule hôte recombinante comprenant un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

Selon un premier aspect, il peut s'agir d'une cellule hôte recombinante d'origine procaryote ou eucaryote.

5           Avantageusement, une cellule recombinante selon l'invention est une bactérie, et de manière tout à fait préférée une bactérie choisie parmi *E.coli* et *Streptomyces*.

          Selon un autre aspect, une cellule hôte recombinante selon l'invention est caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure ou encore d'un  
10 champignon filamenteux.

          L'invention a également trait à une collection de cellules hôtes recombinantes, chacune des cellules hôtes constitutive de la collection comprenant un acide nucléique provenant d'une collection d'acides nucléiques réalisée conformément à un procédé de préparation d'une  
15 collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes tel que décrit ci-dessus.

          L'invention est également relative à une collection de cellules hôtes recombinantes, chacune des cellules hôtes constitutives de la collection comprenant un vecteur recombinant selon l'invention.

20           En raison de la grande taille des inserts il est nécessaire d'avoir une efficacité maximale de transformation. Dans ce but, une souche réceptrice de *Streptomyces lividans* exprimant l'intégrase de pSAM2 de façon constitutive afin de favoriser l'intégration site-spécifique du vecteur est préférée. Pour cela, le gène *int* sous contrôle d'un promoteur fort est  
25 intégré dans le chromosome. La surproduction d'intégrase n'induit pas de phénomènes d'excision (Raynal et al., 1998).

          La production d'un nouveau métabolite à partir de l'insert pourrait être toxique pour *Streptomyces* si l'insert ne contient pas de gènes de résistance à l'antibiotique produit ou si ce gène est peu ou pas  
30 exprimé. La capacité des différents gènes permettant à *Streptomyces ambofaciens* de résister à l'antibiotique qu'il produit est étudiée (Gourmelen et al., 1998; Pernodet et al., 1999). Certains de ces gènes codent des transporteurs de type ABC susceptibles de conférer un large spectre de résistance. Ces gènes peuvent être introduits et surexprimés  
35 dans la souche hôte de *Streptomyces lividans*.

A l'inverse, une souche hypersensible aux antibiotiques peut être utilisée (Pernodet et al., 1996), afin de détecter dans la banque la présence de gènes de résistance. En effet, chez les micro-organismes producteurs d'antibiotique, ces gènes de résistance sont souvent  
5 associés aux gènes de la voie de biosynthèse de l'antibiotique. La sélection de clones résistants peut permettre d'effectuer simplement un premier tri avant les tests plus complexes de détection d'un nouveau métabolite produit par le clone.

10 **ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE NOUVELLES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES POLYKETIDES SYNTHASES.**

Selon l'invention, une collection de cellules hôtes  
15 recombinantes a été obtenue après transfection des cellules hôtes par une collection de vecteurs recombinants contenant chacun un insert d'acide nucléique provenant d'une collection d'acides nucléiques préparée conformément au procédé selon l'invention.

Plus précisément, les fragments d'ADN obtenus selon le  
20 procédé de l'invention dans lequel il est mis en oeuvre une étape d'extraction indirecte d'ADN des organismes contenus dans l'échantillon de sol ont été tout d'abord clonés dans le cosmide intégratif pOS700I.

L'étape d'insertion des fragments d'ADN dans le cosmide  
25 intégratif pOS700I a été réalisée selon le procédé de l'invention dans lequel des queues de polynucléotides homopolymériques poly(A) et poly(T) ont été ajoutées à l'extrémité 3' respectivement de l'acide nucléique du vecteur et des fragments d'ADN à insérer.

Les vecteurs recombinants ainsi construits ont été encapsidés  
dans des têtes de phage lambda et les phages obtenus ont été utilisés  
30 pour infecter des cellules de *E. coli* selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Une banque d'environ 5000 clones de *Escherichia coli* a été obtenue.

Cette banque de clones a été criblée avec des couples  
35 d'amorces spécifiques d'une séquence nucléotidique codant pour une

enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des polykétides, l'enzyme PKS de type I, aussi désignée  $\beta$ -kétosynthase.

On rappelle ici que les polykétides constituent une classe chimique d'une grande diversité structurale comprenant un nombre important de molécules d'intérêt pharmaceutique tels que la tylosine, la monensine, la ivermectine, l'érythromycine, la doxorubicine ou encore le FK506.

Les polykétides sont synthétisés par condensation de molécules d'acétate sous l'action d'enzymes appelées polykétide synthases (PKSs). Il existe deux types de polykétide synthases. Les polykétide synthases de type II sont impliquées en général dans la synthèse des antibiotiques aromatiques polycycliques et catalysent la condensation d'unités acétate de façon itérative.

Les polykétide synthases de type I sont impliquées dans la synthèse des polykétides macrocycliques ou macrolides et constituent des enzymes modulaires multifonctionnelles.

Compte-tenu de leur intérêt thérapeutique, il existe un besoin dans l'état de la technique d'isoler et de caractériser de nouvelles polykétides synthases qui peuvent être utilisées pour la production de nouveaux composés pharmaceutiques, notamment de nouveaux composés pharmaceutiques à activité antibiotique.

Le criblage de la banque de clones recombinants décrite ci-dessus à l'aide d'amorces PCR amplifiant sélectivement des séquences nucléotidiques codant pour des polykétide synthases de type I a permis d'identifier des clones recombinants contenant des inserts d'ADN comprenant une séquence nucléotidique codant pour de nouvelles polykétide synthases. Les séquences nucléotidiques codant pour ces nouvelles polykétides synthases sont référencées comme les séquences SEQ ID N°33 à SEQ ID N°44 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120.

Un autre objet de l'invention consiste en un acide nucléique codant pour une nouvelle polykétide synthase I, caractérisé en ce qu'il comprend l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID N°34 à SEQ ID N°44 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120.

De préférence, un tel acide nucléique se présente sous une forme isolée et/ou purifiée.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant comprenant un polynucléotide comprenant l'une des séquences SEQ ID N°34 à SEQ ID N°44 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120

L'invention a également trait à une cellule hôte recombinante  
5 comprenant un acide nucléique choisi parmi les polynucléotides comprenant l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID N°34 à SEQ ID N°44 et SEQ ID N° 115 à SDEQ ID N°120 ainsi qu'à une cellule hôte recombinante comprenant un vecteur recombinant dans lequel est inséré un polynucléotide comprenant l'une des séquences  
10 nucléotidiques SEQ ID N°34 à SEQ ID N°44 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120.

Avantageusement, les vecteurs recombinants contenant un insert d'ADN codant pour une nouvelle polykétide synthase de type I selon l'invention sont des vecteurs de clonage et d'expression.

15 De préférence, une cellule hôte recombinante telle que décrite ci-dessus est une bactérie, une levure ou encore un champignon filamenteux.

Les séquences en acides aminés de nouvelles polykétide synthases provenant d'organismes contenus dans un échantillon de sol  
20 ont été déduites des séquences nucléotidiques SEQ ID N°34 à SEQ ID N°44 ET SEQ ID N° 115 à SEQ ID N°120 ci-dessus. Il s'agit des polypeptides comprenant l'une des séquences en acides aminés SEQ ID N°48 à SEQ ID N°59 et SEQ ID N° 121 à 126.

L'invention concerne encore de nouvelles polykétides synthases comprenant une séquence en acides aminés choisie parmi  
25 les séquences SEQ ID N°48 à SEQ ID N°59 et SEQ ID N° 121 à SEQ ID N°126.

Fait également partie de l'invention la séquence nucléotidique SEQ ID N°114 qui comprend six cadres ouverts de lecture qui codent  
30 respectivement les polypeptides de séquences SEQ ID N°121 à SEQ ID N°126.

Fait également partie de l'invention la séquence nucléotidique SEQ ID N°113 du cosmide a26G1, qui contient la séquence complémentaire de la séquence SEQ ID N°114.

On a aussi extrait et amplifié selon l'invention de l'ADN génomique provenant de souches bactériennes pures, telles que *Streptomyces coelicolor* (ATCC N°101.478), *Streptomyces ambofaciens* (NRRL N°2.420), *Streptomyces lactamandurans* (ATCC N°27.382),  
5 *Streptomyces rimosus* (ATCC N°109.610), *Bacillus subtilis* (ATCC N°6633) ou encore *Bacillus licheniformis* et *Saccharopolyspora erythraea*.

Une amplification par PCR de l'ADN de chacune des souches bactériennes décrites ci-dessus a été effectuée à l'aide des couples d'amorces spécifiques des séquences nucléiques de polykétide  
10 synthase de type I.

De nouveaux gènes de polykétide synthases de type I bactériennes ont ainsi pu être isolés et caractérisés. Il s'agit des séquences nucléiques de séquences SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32.

L'invention a donc en outre pour objet des séquences  
15 nucléotidiques codant pour de nouvelles polykétides synthases de type I choisies parmi les polynucléotides comprenant l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32.

Font également partie de l'invention des vecteurs recombinants comprenant les séquences nucléotidiques codant pour de nouvelles  
20 polykétides synthases de type I définies ci-dessus.

L'invention concerne aussi des cellules hôtes recombinantes caractérisées en ce qu'elles contiennent un acide nucléique codant pour une nouvelle polykétide synthase de type I comprenant une séquence  
25 nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32 ainsi que des cellules hôtes recombinantes comprenant un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

L'invention a également pour objet des polypeptides codés par des séquences comprenant les acides nucléiques SEQ ID N° 30 à 32, et plus précisément des polypeptides comprenant les séquences d'acides  
30 aminés SEQ ID N° 47 à SEQ ID N° 50.

L'invention a en outre pour objet un procédé de production d'une polykétide synthase de type I selon l'invention, ledit procédé de production comprenant les étapes suivantes:



- obtention d'une cellule hôte recombinante comprenant un acide nucléique codant pour une polykétide synthase de type I comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°33 à SEQ ID N°44, SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120;

- culture des cellules hôtes recombinantes dans un milieu de culture approprié;

- récupération et, le cas échéant, purification de la polykétide synthase de type I à partir du surnageant de culture ou du lysat cellulaire.

Les nouvelles polykétide synthases de type I obtenues selon le procédé décrit ci-dessus peuvent être caractérisées par fixation sur une colonne de chromatographie d'immuno-affinité sur laquelle des anticorps reconnaissant ces polykétides synthases ont été préalablement immobilisés.

Les polykétide synthases de type I selon l'invention, et plus particulièrement les polykétide synthases recombinantes décrites ci-dessus peuvent être aussi purifiées par des techniques de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), telles que par exemple des techniques de chromatographie en phase inverse ou de chromatographie d'échanges d'anions ou de cations, bien connues de l'homme du métier.

Les polykétide synthases, recombinantes ou non recombinantes, selon l'invention peuvent être utilisées pour la préparation d'anticorps.

Selon un autre aspect, l'invention a donc encore pour objet un anticorps reconnaissant spécifiquement une polykétide synthase de type I selon l'invention ou un fragment peptidique d'une telle polykétide synthase.

Les anticorps selon l'invention peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés à partir

de cellules d'hybridome selon la technique décrite par KOHLER et MILSTEIN C. (1975), Nature, Vol.256:495.

Les anticorps polyclonaux peuvent être préparés par immunisation d'un mammifère, en particulier des souris, des rats ou des lapins avec une polykétide synthase de type I selon l'invention, le cas échéant en présence d'un composé adjuvant de l'immunité, tels que l'adjuvant complet de Freund, l'adjuvant incomplet de Freund, l'hydroxyde d'aluminium ou encore un composé de la famille des muramyl peptides.

Constituent également des " anticorps " au sens de la présente invention, les fragments d'anticorps tels que les fragments Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, ou encore les fragments d'anticorps simple chaîne contenant la partie variable (ScFv) décrits par MARTINEAU et al. (1998) J. Mol. Biol., Vol.280 (1):117-127 ou encore dans le brevet US 4,946,778, ainsi que les anticorps humanisés décrits par REINMANN KA et al. (1997), AIDS Res. Hum. Retroviruses, vol.13(11):933-943 ou par LEGER O.J et al. (1997), Hum. Antibodies, vol.8 (1): 3-16.

Les préparations d'anticorps selon l'invention sont utiles notamment dans des tests immunologiques qualitatifs ou quantitatifs visant, soit à simplement détecter la présence d'une polykétide synthase de type I selon l'invention, soit à quantifier la quantité de cette polykétide synthase, par exemple dans le surnageant de culture ou le lysat cellulaire d'une souche bactérienne susceptible de produire une telle enzyme.

Un autre objet de l'invention consiste en un procédé de détection d'une polykétide synthase de type I selon l'invention ou un fragment peptidique de cette enzyme, dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de :

a) mettre en contact un anticorps selon l'invention avec l'échantillon à tester;

b) détecter le complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

L'invention est également relative à un kit ou nécessaire de détection d'une polykétide synthase de type I selon l'invention dans un échantillon, comprenant :

- a) un anticorps selon l'invention;
- 5 b) le cas échéant, des réactifs nécessaires à la détection du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

Un anticorps dirigé contre une polykétide synthase de type I selon l'invention peut être marqué à l'aide d'un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, selon des procédés bien connus de l'homme du métier.

Le criblage d'une banque d'ADN selon l'invention à l'aide d'une paire d'amorces hybridant avec des séquences cibles dont la présence est recherchée, telles que des séquences de la voie de biosynthèse de la puromycine, des séquences du gène *linA* impliquées dans la biodégradation du lindane ou encore des séquences codant pour des polykétides synthases de type I ont été détaillées ci-avant.

L'invention a donc pour objet un procédé de détection d'un acide nucléique de séquence nucléotidique déterminée, ou de séquence nucléotidique structuralement apparentée à une séquence nucléotidique déterminée, dans une collection de cellules hôtes recombinantes selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- mettre en contact la collection de cellules hôtes recombinantes avec un couple d'amorces hybridant avec la séquence nucléotidique déterminée ou hybridant avec la séquence nucléotidique structurellement apparentée à une séquence nucléotidique déterminée;
- 25 - réaliser au moins trois cycles d'amplification ;
- détecter l'acide nucléique éventuellement amplifié.

Pour les conditions d'amplification appropriées en fonction des séquences cibles recherchées, l'homme du métier pourra se référer avantageusement aux exemples ci-dessous.

Selon un autre aspect, l'invention concerne aussi un procédé de détection d'un acide nucléique, de séquences nucléotidiques déterminées, ou de séquences nucléotidiques structurellement apparentées à une séquence nucléotidique déterminée, dans une

collection de cellules hôtes recombinantes selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- mettre en contact la collection de cellules hôtes recombinantes avec une sonde hybridant avec la séquence nucléotidique déterminée ou hybridant avec une séquence nucléotidique structurellement apparentée à la séquence nucléotidique déterminée;
- détecter l'hybride éventuellement formé entre la sonde et les acides nucléiques compris dans les vecteurs de la collection.

10 Pour effectuer le criblage d'une banque d'ADN selon l'invention en vue de détecter la présence d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide capable de dégrader le lindane, on a détecté les clones recombinants d'intérêt par leur phénotype correspondant à leur capacité à dégrader le lindane. Dans ce but, les clones isolés et/ou des  
15 ensembles de clones de la banque d'ADN préparée ont été mis en culture dans un milieu de culture en présence de lindane et la dégradation du lindane a été observée par la formation d'un halo trouble dans l'environnement immédiat des cellules.

L'invention concerne aussi un procédé pour identifier la  
20 production d'un composé d'intérêt par une ou plusieurs cellules hôtes recombinantes dans une collection de cellules hôtes recombinantes selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- culture des cellules hôtes recombinantes de la collection dans un milieu de culture approprié;
- détection du composé d'intérêt dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire d'une ou plusieurs des cellules recombinantes cultivées.

L'invention a en outre pour objet un procédé pour sélectionner une cellule hôte recombinante produisant un composé d'intérêt dans une  
30 collection de cellules hôtes recombinantes selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- culture des cellules hôtes recombinantes de la collection dans un milieu de culture approprié;

- détection du composé d'intérêt dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire d'une ou plusieurs des cellules hôtes recombinantes cultivées;

- sélection des cellules hôtes recombinantes produisant le composé d'intérêt.

L'invention concerne encore un procédé pour la production d'un composé d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- cultiver une cellule hôte recombinante sélectionnée selon le procédé décrit ci-dessus;

- récupérer et, le cas échéant, purifier, le composé produit par ladite cellule hôte recombinante.

L'invention est également relative à un composé d'intérêt caractérisé en ce qu'il est obtenu selon le procédé ci-dessus décrit.

Un composé d'intérêt selon l'invention peut consister en un polykétide produit grâce à l'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°33 à 44, SEQ ID N°30 à 32 et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120.

L'invention concerne encore une composition comprenant un polykétide produit grâce à l'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°33 à SEQ ID N°44, SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32, et SEQ ID N°115 à SEQ ID N°120.

Un polykétide produit grâce à l'expression d'au moins une séquence nucléotidique ci-dessus est préférentiellement le produit de l'activité de plusieurs séquences codantes incluses au sein d'un opéron fonctionnel dont les produits de traduction sont les différentes enzymes nécessaires à la synthèse d'un polykétide, l'une des séquences ci-dessus étant comprise et exprimée dans ledit opéron. Un tel opéron comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'invention codant pour une polykétide synthase peut être construit par exemple selon l'enseignement de Borchert et al. (1992).

L'invention est encore relative à une composition pharmaceutique comprenant une quantité pharmacologiquement active

d'un polykétide selon l'invention, le cas échéant en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible.

De telles compositions pharmaceutiques seront avantageusement adaptées pour l'administration, par exemple par voie parentérale, d'une quantité d'un polykétide synthétisé par une polykétide synthase de type I selon l'invention allant de 1 µg/kg par jour à 10 mg/kg par jour, de préférence au moins 0,01 mg/kg par jour et de manière tout à fait préférée entre 0,01 et 1 mg/kg par jour.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être indifféremment administrées par voie orale, rectale, parentérale, intraveineuse, sous-cutanée ou encore intradermique.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un polykétide obtenu grâce à l'expression d'une polykétide synthase de type I selon l'invention pour la fabrication d'un médicament, en particulier d'un médicament à activité antibiotique.

L'invention sera en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples ci-après.

La figure 1 illustre le schéma des différentes étapes de lyse effectuées selon les protocoles 1, 2, 3n 4a, 4b, 5a, et 5b décrits à l'exemple 1.

La Figure 2 illustre une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des ADN extraits à partir de 300 mg du sol n°3 (Côte St André) après différents traitements de lyse (protocoles 1 à 5, cf. Fig. 1). M : marqueur de poids moléculaire de phage lambda

La Figure 3 illustre la proportion de différents genres d'actinomycètes cultivés à la suite des traitements 1 à 5 (cf. Fig. 1). Le nombre d'ufc (unité formant colonie) a été déterminé sur un milieu sélectif pour ce groupe de bactéries. Un nombre total d'environ 400 colonies a été analysé.

La Figure 4 illustre la récupération d'ADN de phage lambda digéré par *HindIII* additionné dans les sols à différentes concentrations avant (G) ou après (G\*) broyage. Les traitements T (chocs thermiques)

et S (sonication) sont des traitements additionnels de lyse. La quantification a été réalisée par analyse au phospho-imageur après hybridation en dot-blot. Un échantillon de chaque sol a été utilisé pour chaque concentration de phage lambda ajouté. Les caractéristiques des  
5 sol sont reproduites dans le tableau 1. Les échantillons correspondant à 10 et 15 µg d'ADN ajouté n'ont pas été traités.

La Figure 5 illustre l'amplification par PCR des ADN extraits à partir de sol n°3 selon les protocoles 1, 2, 3, 5a et 5b. Les amorces  
10 FGPS 122 et FGPS 350 (tableau 2) ont été utilisés afin de cibler *Streptosporangium spp.* indigènes. Les extraits d'ADN ont été utilisés non dilués ou dilués au 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup>. M : marqueur de poids moléculaires 123 pb (Gibco BRL), C : contrôle d'amplification sans ADN.

15 La Figure 6 illustre les quantités d'ADN extrait après inoculation de spores (a) ou de mycélium (b) de *S. lividans* OS48.3 inoculés dans les sols à différentes concentrations. La quantités de mycélium ajoutée dans le sol correspond au nombre de spores inoculées dans le milieu de germination. Environ 50% des spores ont germé, le nombre de cellules  
20 ou de génomes contenues dans les hyphes des spores germées n'a pas été déterminé. Les quantités de spores et de mycélium inoculées ne sont donc pas directement comparables. Le protocole d'extraction a été mené selon le protocole 6 (cf. section matériel et méthodes). Le symbole (') indique que de l'ARN a été inclus dans le tampon d'extraction. L'ADN  
25 cible a été amplifié par PCR avec les amorces FGPS 516 et FGPS 517, la quantification a été réalisée par phosphoimageur après hybridation en dot blot en utilisant le sonde FGPS 518. Un échantillon de chaque sol a été utilisé pour chaque concentration d'hyphes ou de spores. Les caractéristiques des sols sont décrites dans le tableau 1.

30 La figure 7 représente l'arbre phylogénétique obtenu par l'algorithme de Neighbour Joining, positionnant les séquences d'ADNr 16S contenues dans la banque d'ADN du sol, par rapport à des bactéries de références cultivées.

35 En grisé: les séquences issues des pools de clones de la banque.

Les valeurs de bootstrap sont indiquées au niveau des noeuds, après rééchantillonnage de 100 répétitions. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. Le numéro d'accès des séquences dans la base de données Genbank est indiqué entre parenthèses.

La figure 8 représente un schéma du vecteur pOSint 1.

La figure 9 représente un schéma du vecteur pWED1.

La figure 10 représente un schéma du vecteur pWE15 (ATCC N° 37503).

La figure 11 représente un schéma du vecteur pOS 700I.

La figure 12 représente un schéma du vecteur pOSV010.

La figure 13 représente le fragment contenant un site "cos" inséré dans le plasmide pOSV010 au cours de la construction du vecteur pOSV 303.

La figure 14 représente un schéma du vecteur pOSV 303.

La figure 15 représente un schéma du vecteur pE116.

La figure 16 représente un schéma du vecteur pOS 700 R.

La figure 17 représente un schéma du vecteur pOSV 001.

La figure 18 représente le schéma du vecteur pOSV 002.

La figure 19 représente un schéma du vecteur pOSV 014.

La figure 20 représente un schéma du vecteur pBAC 11.



La figure 21 représente un schéma du vecteur pOSV 403.

La figure 22 représente les gels d'électrophorèse d'ADN de la banque après digestion par les enzymes BamHI et DraI des clones positifs de la banque criblée avec les oligonucléotides PKS-I.

La figure 23 illustre la production de puromycine par les recombinants de *S. lividans* comparée à la production de la souche sauvage *S. alboniger*.

10

La Figure 24 illustre l'alignement de PKSs du sol avec les sites actifs conservés d'autres PKSs. Les références pour chaque peptide sont indiquées. Les domaines béta-kétoacyl synthase ont été alignés en utilisant le programme PILEUP de GCG (Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group, Madison, Wisc).

15

La Figure 25 illustre la construction d'un cosmide intégratif conjugatif.

20

La Figure 26 illustre la construction d'un BAC intégratif conjugatif.

La figure 27 illustre le schéma de construction du vecteur pOSV 308.

25

La figure 28 illustre le schéma de construction du vecteur pOSV306.

La figure 29 illustre le schéma de construction du vecteur pOSV307.

30

La figure 30 illustre le schéma de construction du vecteur PMBD-1.

La figure 31 présente une carte détaillée du plasmide pMBD-2 ainsi qu'un schéma de construction du vecteur pMBD-3.

La figure 32 illustre une carte détaillée du plasmide pMBD-4.

La figure 33 illustre le schéma de construction du plasmide pMBD-5 à partir du plasmide pMBD-1.

La figure 34 illustre la carte détaillée du vecteur pBTP-3.

La figure 35 illustre le schéma de construction du vecteur pMBD-6 à partir du vecteur pMBD-1.

La figure 36 illustre la carte du cosmide a26G1 dont l'insert d'ADN contient des cadres ouverts de lecture codant pour plusieurs polykétides synthase.

La figure 37 est un schéma représentant l'insert d'ADN (brin +) du cosmide a26G1, sur lequel sont positionnés les différents cadres de lecture codant pour plusieurs polykétides synthase.

### **EXEMPLES:**

**EXEMPLE 1: Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes, comprenant une étape d'extraction directe d'ADN à partir de l'échantillon de sol.**

## **1. MATERIEL ET METHODES**

**1.1 SOLS:** Les caractéristiques des six sols utilisés dans cette étude sont listées dans le tableau 1.

La teneur en argile et en matière organique va respectivement de 9 à 47% et de 1,7 à 4,7%, le pH variant de 4,3 à 5,8.

Des échantillons de sol ont été collectés à partir de la couche superficielle de 5 à 10 cm de profondeur. Toutes les racines visibles ont

été éliminées et les sols ont été conservés à 4°C pendant quelques jours si nécessaire, après quoi ils ont été séchés pendant 24 heures à la température ambiante et tamisés (taille moyenne de maille 2 mm) avant d'être conservés jusqu'à plusieurs mois à 4°C.

5

## **1.2 SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE:**

L'ADN extracellulaire ainsi que les souches bactériennes fournissant des cellules végétatives, des spores ou des hyphae, utilisées pour inoculer les échantillons de sol, ont été choisies de telle sorte que leur présence

10

puisse être suivie spécifiquement.

Afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN extracellulaire, la souche lysogénique de *E.coli* 1192 Hfr P4X (metB), contenant le phage lambda CI857 Sam7, a été cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB) pendant deux heures à 30°C, puis 30 minutes à 40°C, puis 3 heures à 37°C.

15

L'ADN du phage lambda a été extrait selon la technique décrite par SAMBROOK J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.

20

La souche avirulente de *Bacillus anthracis* (STERNE 7700) a été utilisée comme inoculum de cellules bactériennes. *Bacillus anthracis* a été multiplié sur un bouillon de culture de type " trypticase soy broth " (TSB) (Biomérieux, Lyon, France) pendant environ 6 heures, en vérifiant que la DO<sub>600</sub> soit maintenue en dessous de 0,6. Ces conditions permettent le développement des cellules végétatives sans formation de spores (Patra et al., (1996), FEMS Immunol. Medical Microbiology, vol.15:223-231.). Les spores de *Streptomyces lividans* OS48.3 (CLERC-BARDIN et al. non publié) ont été éliminées mécaniquement des cultures de l'organisme sur un milieu R2YE (HOPWOOD et al., (1985), Genetic Manipulation of *Streptomyces*-A Laboratory Manual. The John Innes Foundation , Norwich ,United Kingdom). Les hyphae de *S.lividans* OS48.3 ont été obtenus à partir des spores en pré-germination, car l'on s'attendait à ce que l'utilisation de hyphae courtes minimise la rupture et la perte subséquente d'ADN. Les spores ont été mises en suspension dans du tampon TES (Acide N-Tris [hydroxyméthyl]méthyl-2-aminoéthanesulfonique ; Sigma-Aldrich Chimie, France) (0,05M; pH 8)

25

30

35

puis ont été soumises à un choc thermique (50°C pendant 10 minutes suivi d'un refroidissement sous un courant d'eau froide puis ajoutées à un volume égal de milieu de pré-germination (extrait de levure 1%, casaminoacides 1% CaCl<sub>2</sub> 0,01 M).

5 La solution a été incubée à 37°C sur un agitateur. La proportion de spores germées a été estimée à environ 50%, en accord avec les résultats de HOPWOOD et al. (1985). Après centrifugation, les culots ont été resuspendus dans du tampon TES, ajoutés à 3% de milieu TSB, et incubés à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>450</sub> de 0,15 (HOPWOOD et  
10 al. , (1985)). *Streptomyces hygroscopicus* SWN 736 et *Streptosporangium fragile* AC1296 (Institute Pushino, Moscou) ont été cultivés selon des techniques décrites par HICKEY et TRESNER (1952).

L'ADN des spores et des hyphae de *S. Lividans* a été extrait à partir des cultures pures selon le protocole de lyse 6 décrit ci-dessous  
15 (excepté qu'aucun broyage n'a été réalisé), tandis que les spores de *S. hygroscopicus* et de *S. fragile* ont été extraites par lyse chimique/enzymatique (Hintermann et al., 1981).

**1.3 CHOIX DU TAMPON D'EXTRACTION:** Un tampon TENP (50 mM  
20 Tris, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% pds/vol de polyvinylpyrrolidone développé par PICARD (1992) a été utilisé. Des tampons similaires ont été ultérieurement utilisés par d'autres auteurs (CLEGG et al., 1997; KUSKE et al., 1998; ZHOU et al., 1996).

Le Tris et l'EDTA protègent l'ADN de l'activité nucléase, le NaCl  
25 apporte un effet dispersant et la PVPP absorbe les acides humiques et les autres composés phénoliques (HOLBEN et al. (1988); PICARD et al., (1992).

Dans cette étude, l'efficacité d'extraction de ce tampon a été évaluée à différents pH (6,0 - 10,0) en utilisant 20 sols différents ayant  
30 une gamme de pH de 5,8 à 8,3 et une teneur en matière organique entre 0,2 et 6,3%. Ces vingt sols (les autres caractéristiques ne sont pas indiquées) ont été utilisés uniquement dans cette expérience. La quantité d'ADN a été déterminée de manière colorimétrique comme décrit par RICHARD (1974), et détaillé ci-après.

35

#### 1.4 PROTOCOLE DE LYSE *IN SITU* ET D'EXTRACTION D'ADN:

Plusieurs protocoles utilisant un nombre croissant d'étapes ont été testés afin d'évaluer l'efficacité de différentes techniques pour lyser les microbes du sol *in situ*. Pour ces expériences, la microflore indigène du sol a été ciblée dans six sols. Des expériences additionnelles ont été conduites afin d'étudier les effets des traitements de lyse sur l'ADN libéré, en analysant les quantités et la qualité d'ADN récupéré provenant d'un ADN de phage lambda préalablement additionné aux sols.

Une fois qu'un protocole optimisé (désigné protocole 6) a été développé, ce protocole a été utilisé pour quantifier l'ADN provenant d'*Actinomycètes* indigènes et d'ADN provenant de bactéries Gram-positives inoculées dans les sols sélectionnés. Dans tous les cas, les échantillons de sol ont été séchés et passés au tamis comme décrit ci-dessus.

Après broyage, 0,5 ml de tampon TENP ont été ajoutés à 200 mg poids sec de sol excepté pour le protocole 1 dans lequel le tampon a été ajouté à un sol non broyé).

Pour les divers traitements de lyse (voir ci-dessous), les suspensions de sol ont été passées au Vortex pendant dix minutes et centrifugées (4000 g pendant cinq minutes), après quoi une fraction aliquote (25 µl) du surnageant a été analysée par électrophorèse sur gel (0,8% d'agarose).

Une autre fraction aliquote du surnageant représentant un volume connu, généralement 350 µl, a été précipitée avec de l'isopropanol.

Cinq fractions aliquotes (représentant de l'ADN dérivé de 1 g de sol) ont été réunies et resuspendues dans 100 µl d'un tampon TE stérile (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) avant purification (protocole D, voir ci-dessous) et quantification, soit par hybridation (Dot Blot) de l'ADN total, soit par hybridation (Dot Blot) des produits d'amplification PCR (voir ci-dessous).

Les signaux d'hybridation ont été quantifiés par imagerie par phosphorescence (technique de "phospho-imaging" voir ci-dessous).

### 1.5 EVALUATION DES METHODES DE LYSE CELLULAIRE *IN SITU*:

La qualité et la quantité de l'ADN extrait après un nombre croissant d'étapes de traitement de lyse (protocole 2-5b) ont été comparées à celles de l'ADN extracellulaire obtenu après lavage du sol avec un tampon d'extraction (protocole 1; voir aussi figure 1).

#### Protocole 1: Pas de traitement de lyse.

Le tampon TENP a été ajouté à un sol non broyé, une étape d'extraction d'ADN a été réalisée comme décrit ci-dessus.

#### Protocole 2. Broyage du sol suivi d'une extraction d'ADN.

Deux types de dispositifs différents ont été utilisés pour le broyage du sol.

Afin de comparer leur efficacité respective, 5g de sol sec ont été broyés pendant 30 secondes dans un broyeur contenant des anneaux de tungstène, ou pendant des temps variés jusqu'à 60 minutes dans un broyeur de sol contenant un mortier et des billes en agate (20 mm de diamètre).

Le tampon TENP est ensuite ajouté et l'ADN est extrait comme décrit ci-dessus.

Les résultats d'électrophorèse sur gel ont montré qu'un broyage de 40 minutes en utilisant des billes en agate étaient nécessaires afin d'obtenir des quantités d'ADN extraits équivalentes à celles obtenues après 30 secondes de broyage en utilisant des anneaux de tungstène.

La distribution de taille des fragments d'ADN est similaire quelle que soit la méthode employée.

Ainsi, ces traitements ont été considérés comme équivalents et celui qui sera utilisé dans les protocoles décrits ci-dessous ne sera en conséquence pas spécifié.

Dans les protocoles 3 à 5, l'efficacité de plusieurs autres traitements de lyse ultérieure au broyage du sol a été testée, soit séparément, soit dans différentes combinaisons.

**Protocole 3:**

Ce protocole est identique au protocole 2 , sauf qu'il comprend une étape d'homogénéisation à l'aide d'un mixeur de type Ultraturrax (Janker et Kunkel, IKA Labortechnik, Allemagne) réglé à la moitié de la vitesse maximale pendant 5 minutes.

**PROTOCOLES 4a et 4b:**

Ces protocoles sont identiques au protocole 3 à l'exception d'une étape additionnelle de sonication.

Deux types de dispositifs sonicateurs ont été comparés : un sonicateur à micropointe de titane (600W Vibracell Ultrasonicator, Bioblock, Illkirch, France) (Protocole 4a) et un sonicateur de type Cup Horn (protocole 4b).

La micropointe Vibracell produisant des ultrasons est en contact direct avec la solution de sol.

En ce qui concerne le dispositif de type Cup Horn, la solution de sol est conservée dans des tubes qui sont placés dans un bain d'eau à travers lequel passent les ultrasons.

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les conditions optimales pour les deux sonicateurs (résultats non présentés).

Le meilleur compromis, en terme de quantité d'ADN extrait et de taille de fragments, consiste en une sonication avec la micropointe de titane et le sonicateur de type Cup Horn respectivement pendant 7 et 10 minutes, en réglant la puissance à 15 W et avec des cycles actifs à 50%.

**Protocoles 5a et 5b:**

Après sonication avec une micropointe de titane ou un dispositif de type Cup Horn (respectivement protocoles 4a et 4b) du lysozyme et de l'achromopeptidase ont été ajoutés, chacune des enzymes à une concentration finale de 0,3 mg/ml.

Les suspensions de sol ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C, après quoi du lauryl sulfate à une concentration finale de 1 % a été ajouté, puis des suspensions ont été incubées pendant 1 heure à 60°C avant centrifugation et précipitation comme décrit ci-dessus.

5 En plus des protocoles décrits ci-dessus, l'effet de la sonication (Cup Horn, voir protocole 4b) et de chocs thermiques (30 secondes dans l'azote liquide suivi de trois minutes dans l'eau bouillante, les traitements étant répétés trois fois ) sur l'ADN de phage lambda digéré par HindIII préalablement ajouté au sol ont été examinés (voir ci-après).

10 Des chocs thermiques ont été suggérés dans l'état de la technique comme des moyens de lyse cellulaire *in situ* (PICARD et al. (1992)). Cependant, du fait qu'un tel traitement a un effet préjudiciable sur l'ADN libre (voir la section résultats) il n'a pas été inclus dans les protocoles décrits ci-dessus.

15

### PROTOCOLE OPTIMISE

Après évaluation des différents traitements de lyse, un protocole optimisé a été défini, désigné protocole 6. Le protocole 6 est  
20 identique au protocole 5b excepté que, avant la sonication, les suspensions de sol sont soumises à un traitement par Vortex puis agitées par rotation sur une roue pendant deux heures avant d'être congelées à - 20°C.

Après décongélation, les suspensions de sol sont passées au  
25 Vortex pendant 10 minutes avant sonication. Le protocole 6 a été utilisé dans les expériences dans lesquelles les sols ont été ensemencés avec des cellules bactériennes ainsi que dans les expériences dans lesquelles les actinomycètes indigènes ont été quantifiés (voir ci-dessous).

30 **1.6 COMPTAGE AU MICROSCOPE:** L'efficacité du broyage du sol comme méthode pour lyser des cellules bactériennes a été examinée au microscope.

5g de sol brut séché ont été mélangés dans un dispositif de type Waring Blender avec 50 ml d'eau stérilisée ultrapure pendant 1,5  
35 minutes; simultanément, 1g (poids sec) de sol broyé (protocole n°2) a



été mis en suspension dans 10 ml par agitation pendant 10 minutes. Les suspensions de sol ont fait l'objet de dilutions en séries et de l'acridine orange a été ajoutée à une concentration finale de 0,001%.

Après 2 minutes, les suspensions ont été filtrées à travers une  
5 membrane de marque NUCLEOPORE de type 0,2 µm black. Chaque filtre a été rincé avec de l'eau stérile lysée, traitée avec 1 ml d'isopropanol pendant 1 minute afin de fixer les cellules bactériennes, puis rincé de nouveau.

Les cellules bactériennes ont été comptées à l'aide d'un  
10 microscope à épifluorescence du type Zeiss Universal avec un objectif 100x. Pour chacun des types de sol, trois filtres ont été comptés, et au moins 200 cellules ont été comptées sur chacun des filtres.

**1.7 NUMERATION DES ACTINOMYCETES CULTIVABLES ET**  
15 **NOMBRE TOTAL D'UNITES FORMANT COLONIES (CFU):** Les actinomycètes ayant survécu aux traitements de lyse (protocoles 1-5) ont été examinés spécifiquement avec le sol n°3 (Côte Saint André, voir tableau 1).

Après une dilution de 10 fois d'une solution d'extrait de levure  
20 (6% poids/volume) et de SDS (0,05%) afin d'induire la germination (Hayakawa et al. (1988)), les suspensions de sol ont été diluées en séries dans de l'eau stérile, incubées à 40°C pendant 20 minutes et ensemencées sur du milieu HV (HAYAKAWA et al., 1987).

Le milieu HV a été additionné de actidione (50 mg/l) et de  
25 nystatine (50 mg/ml).

Les colonies d'actinomycètes ont été comptées après incubation pendant 15 jours à 28°C.

Au total, environ 400 colonies ont été examinées. L'identification a été réalisée sur la base des caractéristiques  
30 morphologiques macro-et microscopiques ainsi que sur l'analyse de la teneur en acide diaminopimélique des isolats (SHIRLING et al., 1966); STANECK et al., 1974; WILLIAMS et al., 1993).

La quantité totale de bactéries cultivables (CFU totales) a été également déterminée pour chacun des protocoles de lyse 1 à 5. Les  
35 suspensions de sol ont été diluées en série et ensemencées en triple sur

un milieu agar Bennett (WAKSMAN et al., 1961) additionné de nystatine et d'actidione (chacune à 50 mg/l).

Chaque boîte de Pétri a été couverte d'un filtre de nitrate de cellulose (Millipore) et incubée pendant trois jours à 28°C. Après la  
5 numération des colonies sur les membranes, les filtres ont été retirées et les boîtes de Pétri ont été à nouveau incubées pendant 7 jours à 28°C puis comptées à nouveau.

**1.8 RECUPERATION DE L'ADN DE PHAGE LAMBDA AJOUTE AUX**  
10 **SOLS:** L'ADN de phage lambda a été digéré avec HindIII, extrait par un mélange de phénol-chloroforme, précipité puis resuspendu dans de l'eau stérile ultrapure selon des protocoles standard (SAMBROOK et al., 1989).

Des dilutions correspondant respectivement à 0, 2,5, 5, 7,5, 10  
15 et 15 µg d'ADN/g de poids sec de sol ont été préparées dans des volumes de 60 µl. Ces dilutions d'ADN ont été ajoutées à des lots de 5g de sol sec qui ont été subséquemment vigoureusement mélangés par vortex pendant 5 minutes avant broyage.

L'ADN de phage lambda a aussi été ajouté à un sol avant  
20 broyage à des concentrations correspondant à 0, 10 et 15 µg d'ADN/g de poids sec du sol.

Après broyage, le tampon d'extraction est ajouté et l'ADN est extrait selon le protocole 2 (voir ci-dessus).

25 **1.9 SATURATION DES SITES D'ADSORPTION AVEC DE L'ARN:** Afin de déterminer si la saturation des sites d'adsorption d'acides nucléiques des colloïdes du sol pouvait augmenter le taux de récupération de l'ADN, le terreau sablonneux (sol n°4) et le sol argileux (sol n°5) ont été incubés avec une solution d'ARN avant tout autre traitement.

30 De l'ARN commercial de *Saccharomyces cerevisiae* (BOHRINGER MANNHEIM, MEYLAN, France) a été dilué dans du tampon phosphate (pH 7,1) et ajouté aux échantillons de sol sec et tamisés (2 ml/g de sol) à des concentrations finales de 20, 50 et 100 mg d'ARN/g de poids sec du sol.

Les tubes contenant les suspensions de sol ont été agités par rotation pendant deux heures à température ambiante. Après centrifugation, les culots de sol ont été séchés au four (50°C) pendant la nuit. L'ADN de phage lambda a ensuite été ajouté aux sols (0, 20 ou 50 µg/g de poids sec du sol) afin de simuler le sort de l'ADN libéré après lyse cellulaire.

L'ADN a été extrait selon le protocole n°2. Il a été déterminé par la suite qu'un effet identique de l'addition d'ARN sur la récupération d'ADN pouvait être atteint en ajoutant l'ARN directement au tampon d'extraction.

Cette procédure simplifiée a été utilisée pour le sol argileux n°5 dans les expériences dans lesquelles les micro-organismes ont été inoculés dans les sols.

L'ARN a ensuite été ajouté à une concentration correspondant à 50 mg d'ARN/g de poids sec du sol.

**1.10 DETERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'EFFICACITE DES PROTOCOLES D'EXTRACTION:** La qualité de l'ADN (absence de dégradation) a été estimée sur la base de la taille des fragments d'ADN ou de la position relative des bandes de migration d'ADN après électrophorèse d'une fraction aliquote d'une solution d'ADN sur un gel d'agarose à 0,8%.

L'intensité de fluorescence a permis une estimation semi-quantitative des rendements d'extraction.

Une autre fraction aliquote a été utilisée pour des déterminations quantitatives de la teneur en ADN par hybridation (Dot Blot) et analyse au phospho-Imager. Le protocole d'hybridation sur tache a été décrit par SIMONET et al. (1990).

Les membranes d'hybridation (GeneScreen plus, Life Science Products, Boston, Etats-Unis d'Amérique) ont été préhybridées pendant au moins 2 heures dans 20 ml d'une solution contenant 6 ml de 20 x SSC, 1 ml de solution de DENHARDT's, 1 ml de SDS à 10% et 5 mg d'ADN de sperme de saumon.

L'hybridation a été réalisée pendant une nuit dans la même solution en présence d'une sonde marquée préalablement à deux

lavages des membranes dans un tampon SSC 2 x pendant 5 minutes à température ambiante, puis un troisième lavage dans du tampon SSC 2 x, SDS 0,1% et un quatrième lavage dans du tampon SSC 1 x, SDS 0,1% pendant 30 minutes à la température d'hybridation.

5 Les signaux d'hybridation ont été quantifiés avec un système d'imagerie radioanalytique BIORAD (Molecular Analyst Software, BIORAD, Ivry S/Seine, France).

Afin de quantifier la quantité totale d'ADN dérivée de la microflore indigène, les différents sols ont été extraits selon les  
10 protocoles n°1 à 5. L'ADN non amplifié a été appliqué sur les membranes de Dot Blot et hybridé en utilisant la sonde universelle FGPS431 (tableau 2).

Cette sonde, qui hybride aux positions 1392-1406 du gène de l'ADNr 16S de *E.coli* (Amann et al. (1995)) a été marquée à ses  
15 extrémités avec un ATP $\alpha^{32}\text{P}$  en utilisant une polynucléotide kinase T4(BOEHRINGER MANNHEIM, Melan, France).

Une courbe de calibration a été préparée à partir de l'ADN de *E.coli* DH5 $\alpha$ . La conversion des calculs aux bactéries du sol a nécessité une simplification, partant de l'hypothèse que le nombre de copies  
20 moyen (*rrn*) est de 7, comme pour *E.coli*.

L'ADN de phage lambda digéré par HindIII a été utilisé pour quantifier la récupération de l'ADN extracellulaire. Des extraits non amplifiés à partir de sols, auxquels de l'ADN de phage lambda avait été ajouté, ont été hybridés avec de l'ADN de phage lambda digéré par  
25 HindIII marqué au hasard en utilisant le fragment Klenow (Boehringer Mannheim, Melan, France).

Les quantités d'ADN ont été calculées par interpolation à partir d'une courbe de calibration préparée avec l'ADN purifié.

La quantité totale d'ADN extrait à partir des sols n°1, 2, 3, 4 et 6  
30 selon le protocole n°2 (broyage) a également été quantifiée de manière colorimétrique selon la technique décrite par RICHARD (1974).

Brièvement, de l'ADN a été mélangé avec du HClO<sub>4</sub> concentré (la concentration finale de HClO<sub>4</sub> était de 1,5 N). On a mélangé 2,5 volumes de cette solution avec 1,5 volumes de DPA (diphénylamine,  
35 Sigma-Aldrich, France) et laissé incubé le mélange à la température

ambiante pendant 18 heures, préalablement à la détermination de la DO à 600 nm. Les extraits d'ADN du sol ont été quantifiés par rapport à une courbe standard réalisée par l'ADN extrait à partir de *E.coli* DH5 $\alpha$  selon les protocoles standards (SAMBROOK et al., (1989)).

5

#### 1.11 DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE QUANTIFICATION D'ADN EN UTILISANT L'AMPLIFICATION PCR ET L'HYBRIDATION:

Pour les amplifications par PCR, de l'ADN polymérase Taq (Appligene Oncor, France) a été utilisé selon les instructions du fabricant.

10 Le programme PCR utilisé pour toutes les amplifications est le suivant: dénaturation initiale pendant 3 minutes à 95°C, puis 35 cycles consistant en 1 minute à 95°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C, suivie par une extension finale à 72°C pendant 3 minutes.

L'ADN isolé et purifié à partir de *Streptosporangium fragile* a été  
15 utilisé comme témoin à des concentrations allant de 100 fg à 100 ng.

Afin d'amplifier spécifiquement l'ADN de ce genre bactérien, on a choisi les amorces FGPS122 et FGPS350 (tableau 2), complémentaires à une partie de l'ADNr 16S, après alignement des séquences d'ADNr 16S d'actinomycètes. Leur spécificité a été testée  
20 sur une collection de souches d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptosporangium* et d'autres genres fortement apparentés).

Les produits de PCR ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique FGPS643 (tableau 2). Afin de simuler le niveau de pureté obtenu en routine avec de l'ADN extrait à partir du sol, des  
25 témoins d'ADN pur de *S. fragile* ont été mélangés avec les extraits de sol obtenus après des traitements selon les protocoles de lyse 4b et 5b puis purifiés selon le protocole D.

Avant utilisation, les extraits de sol ont été traités avec de la DNase (une unité de DNase/ml, GIBCO BRL) pendant 30 minutes à  
30 température ambiante. La DNase a ensuite été inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes. Une vérification de l'inactivation a été réalisée par PCR. Les concentrations d'acides humiques ont été mesurées par spectrophotométrie (DO<sub>280nm</sub>) contre une courbe standard d'acides humiques commerciaux (Sigma).

Des solutions de sol traitées à la Dnase non diluées, diluées 10x et diluées x 100 ont été mélangées de 100. fg à 100ng d'ADN de *S. fragile* avant l'amplification par PCR. Dans une autre série d'expériences, les concentrations croissantes d'ADN de *Streptomyces*  
5 *hygroscopicus* de (100 pg à 1 µg) ont été ajoutées à l'ADN de *S. fragile* afin de simuler la présence d'ADN non-cible et son influence sur le procédé PCR.

**1.12 PURIFICATION DES EXTRAITS D'ADN BRUT:** Quatre méthodes  
10 de purification d'ADN ont été comparées. L'ADN a été extrait à partir de 1g (poids sec de sol selon le protocole 4a et remis en suspension dans 100 µl de tampon TE8 (50 mM Tris, 20 mM (EDTA, pH 8,0).

#### Protocole A

15 Elution à travers deux colonnes successives Elutip d (SCHLEICHER et SCHUELL, Dassel, Allemagne) (PICARD et al., (1992)).

#### Protocole B:

20 Elution à travers une colonne SEPHACRYL S200 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) suivie d'une élution à travers une colonne Elutip d (NESME et al. (1995)).

#### Protocole C:

25 Séparation à l'aide d'un système aqueux à deux phases avec 17,9% (poids/poids) de PEG 8000 (Merck, Darmstadt, Allemagne) et  
30 14,3% (poids/poids) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(ZASLAVSKY,(1995)).

Après un mélange vigoureux au vortex, les deux phases ont été laissées à température ambiante pour leur séparation.

1 ml de chacune des phases a été transféré dans un autre tube, mélangé avec 100µl de l'échantillon et laissé à 4°C pendant une  
35 nuit pour permettre la séparation.

La phase inférieure a été dialysée pendant une heure à travers une membrane Millipore en présence d'un excès d'un tampon TE 7,5 (10 mM Tris, 1 mM EDTA à pH 7,5 et 1 M Mg Cl<sub>2</sub>) afin d'éliminer les sels en excès.

5

#### Protocole D:

Elution à travers une colonne de type Microspin Sephacryl S400 HR (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) , suivie d'une élution à travers une colonne de type Elutip d.

Chaque protocole est terminé par une étape de précipitation à l'éthanol, et l'ADN est remis en suspension dans 10 µl de tampon TE 7,5. L'efficacité des protocoles de purification a été vérifiée par amplification PCR de fractions aliquotes non diluées des solutions d'ADN et de fractions aliquotes diluées 10 et x 100 fois, en utilisant des protocoles standard (voir ci-dessous).

15

#### **1.13 RECUPERATION DE L'ADN A PARTIR DE MICROORGANISMES INNOCULES:**

Les cellules, spores et hyphae ont été lavées deux fois et dénombrées par comptage sur plaque ou comptage microscopique direct. Des lots de 5g de sol sec et tamisé (sols n°2, 3 et 5) ont été inoculés avec 100 µl d'une suspension de spores et d'hyphae de *S. lividans* à des concentrations correspondant à 0,10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> et 10<sup>9</sup> spores/g de poids sec de sol, ou avec des cellules végétatives de *B.anthraxis* à des concentrations correspondant à 0,10<sup>7</sup> et 10<sup>9</sup> cellules par gramme de poids sec du sol.

25

Les quantités de hyphae de *S. lividans* ont été calculées sur la base du nombre de spores desquelles elles sont originaires. Après addition des suspensions bactériennes, les échantillons de sol sont mélangés vigoureusement par vortex pendant 5 minutes avant broyage. L'ADN est extrait selon le protocole n°6 (voir ci-dessous).

30

L'amplification PCR suivie d'une hybridation sur tache (Dot Blot) et imagerie par phosphorescence (phospho-imaging) a été utilisée afin

de quantifier les quantités d'ADN récupérées à partir des cellules, des spores et du mycélium bactérien inoculé dans les sols.

L'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole de lyse n°6. L'amplification PCR et l'hybridation ont été réalisées comme décrit ci-dessus. Les amorces et les sondes sont ciblées sur des régions chromosomiques localisées en dehors de la région 16S, et sont hautement spécifiques des organismes respectifs, de manière à éviter des signaux de bruit de fond.

Pour les sols ensemencés avec *B. anthracis*, les amorces R499 et R500 ont été utilisées (Patra et al. (1996)) et les produits d'amplification ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique C501 (tableau 2).

Pour les sols ensemencés avec *S. lividans*, les réactions PCR ont été réalisées en utilisant les amorces FGPS516 et FGPS517, et les produits d'amplification ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique FGPS518 (tableau 2).

La région amplifiée est une partie de la cassette construite spécifiquement pour obtenir la souche OS48.3 (CLERC-BARDIN et al., non publié).

Les comptes de calibration ont été dans tous les cas obtenus en utilisant l'ADN purifié de l'organisme cible.

## **2. RESULTATS**

### **2.1 CHOIX DU TAMPON D'EXTRACTION:**

20 sols différents ont été utilisés afin de déterminer le pH optimal du tampon d'extraction d'ADN. Pour tous les sols, le rendement en ADN augmente avec les pH croissants du tampon. Le rendement pour chaque pH (+/- sd), calculé comme le pourcentage de la valeur la plus haute pour chacun des sols, est le suivant: pH 6,0 : 31 +/- 13; pH 7,0: 43 +/- 16; pH 8,0: 60 +/- 14; pH 9,0: 82 +/- 12; pH 10,0: 98 +/- 3.

Pour 16 des 20 sols, le rendement le plus élevé a été obtenu à pH 10,0, alors que pour les quatre autres sols le plus haut rendement a



été obtenu à pH 9,0. Cependant, à pH 10,0, des quantités plus grandes de matériel humique ont été libérées, comparées à pH 9,0 (résultats non présentés). En conséquence, le pH 9,0 a été choisi pour toutes les expériences présentées ci-dessous.

5

## 2.2 EFFICACITE DES PROTOCOLES D'EXTRACTION D'ADN:

L'ADN total des organismes indigènes du sol a été extrait et quantifié de manière à évaluer l'efficacité de nombreux protocoles de lyse cellulaire *in situ*. Des échantillons des sols 1-6 (tableau 1) ont été traités selon les protocoles n°1 à 5 décrits dans la section Matériel et Méthodes (figure 1).

Après l'extraction d'ADN, les suspensions de sols ont été précipitées avec de l'isopropanol, et des fractions aliquotes des culots remis en suspension ont été analysées par électrophorèse sur gel, dans une première étape, afin d'estimer la qualité et la quantité de l'ADN libéré.

Cependant, la couleur de l'extrait d'ADN devenait de plus en plus sombre au fur et à mesure du nombre croissant d'étapes de lyse, du fait de la co-extraction de composés, tels que les acides humiques, avec l'ADN.

Certains de ces extraits bruts de couleur sombre ne migrent pas de la manière attendue dans les gels d'agarose.

En conséquence, les solutions d'ADN brut ont été purifiées (protocole B) avant quantification. Les électrophorèses sur gel des solutions purifiées obtenues après les différents traitements de lyse sont exemplifiées sur le sol n°3 (figure 2).

Une comparaison visuelle au rayonnement ultra-violet des intensités de l'ADN coloré a permis une estimation semi-quantitative de l'efficacité des traitements. De plus, la présence de profils de migration de tailles multiples de fragments (bandes discrètes) d'ADN et la disparition des fragments longs indique qu'une dégradation de l'ADN a eu lieu.

Aucun ADN n'a pu être extrait du sol argileux n°5.

Une quantification plus précise de l'ADN de tous les sols, extrait selon les protocoles n°1 à 5, a été réalisée par hybridation sur tache (Dot Blot) sans étape d'amplification PCR préalable et en utilisant une sonde oligonucléotidique complémentaire d'une séquence hautement conservée de la région d'ADNr 16S (sonde FGPS 431, tableau 2).

L'ADN a été détecté dans les extraits de tous les sols après chacune des différentes étapes de lyse, à l'exception du sol argileux n°5.

Les résultats concordent avec les estimations réalisées après gel d'électrophorèse.

Afin de comparer avec une méthode indépendante pour la quantification, l'ADN extrait selon le protocole n°2 (tous les sols sauf le sol n°5) a été également quantifié en utilisant une méthode colorimétrique de détection de l'ADN (RICHARD, 1974).

On a trouvé une bonne corrélation ( $r = 0,88$ ) entre l'ADN quantifié en utilisant cette technique colorimétrique et les résultats obtenus par hybridation de type Dot Blot/radio-imagerie, confirmant l'hypothèse selon laquelle le nombre de copies moyen des bactéries du sol (rrn) est de 7.

L'hybridation (Dot Blot) a montré que les quantités d'ADN extracellulaires, comme déterminé par extraction sans traitement de lyse (protocole n°1), allait de  $4\mu\text{g/g}$  pour le sol acide (n°6) à  $36\mu\text{g/g}$  pour le sol n°3 (tableau 3).

Le broyage du sol (protocole n°2) a augmenté les quantités d'ADN extrait à partir de tous les sols (p.ex.  $26\mu\text{g/g}$  de sol) pour le sol n°6 et  $59\mu\text{g/g}$  de sol (pour le sol n°3) (tableau 3; figure 2).

Pour les deux traitements de broyage (voir la section Matériel et Méthodes) la migration discrète d'ADN a été détectée sur les gels d'agarose, indiquant que les molécules d'ADN ont été partiellement dégradées (figure 2).

La taille des fragments d'ADN est comprise entre 20 et 0,2 kb. L'intensité de bande des fragments les plus petits est très faible, indiquant que la majeure partie des fragments ont une taille bien supérieure à 1 kb.

Le protocole n°3 comprend une étape d'homogénéisation dans un dispositif mixeur de type Ultraturax après l'addition du tampon

d'extraction aux échantillons de sol. Cette étape conduit à une augmentation des quantités d'ADN extrait, comme déterminé par hybridation sur tache (Dot Blot) pour deux des sols (le terreau sablonneux n°3 et le sol acide n°6), alors que les deux sols riches en matière organique (sols n°1 et n°2) ont conduit à l'obtention de quantités plus faibles d'ADN.

Les protocoles n°4a et n°4b ont permis d'évaluer l'influence de deux types de sonication sur les rendements en ADN à partir de sols préalablement broyés et homogénéisés .

La sonication n'a pas eu d'effet positif sur le rendement en ADN, comparé au protocole n°3, excepté pour le sol n°6. Toutefois, l'efficacité de lyse des deux types de sonicateur différent. Pour les sols n°2, 3 et 4, les quantités d'ADN extraits les plus grandes ont été obtenues en utilisant la micropointe de titane (tableau 3; figure 2), alors que pour les sols n°1 et n°6, le rendement en ADN était supérieur en utilisant le dispositif Cup Horn.

Des résultats contradictoires ont été également obtenus lorsque l'on a ajouté une étape de lyse enzymatique/chimique (protocoles n°5a et 5b) après l'étape de sonication: dans certains cas, les quantités d'ADN extraites ont été plus grandes que celles récupérées selon les protocoles n°4a et 4b, alors que dans d'autres cas les rendements étaient moindres (tableau 3).

### 2.3 COMPTAGE DIRECT DES MICRO-ORGANISMES:

Des comptes au microscope du nombre total de cellules bactériennes après coloration à l'acridine orange ont été réalisés pour tous les sols, avant et après broyage.

Avant broyage, le nombre de bactéries par gramme de poids sec du sol allait de  $1,4 \times 10^9$  (+/- 0,4) dans le sol tropical n°5 à  $10 \times 10^9$  (+/- 0,7) dans le sol provenant de la Côte Saint-André (sol n°3) (tableau 1).

Après broyage, les nombres de cellules ont été respectivement de 45, 74, 75, 54, 34 et 75% des valeurs initiales pour les sols n°1 à 6.

## 2.4 NUMERATION DES ACTINOMYCETES CULTIVABLES APPARTENANT A DIFFERENTS GENRES:

Une modification dans les populations d'actinomycètes dans le sol n°3 a  
5 été remarquée après les différents traitements de lyse (figure 3).

Par exemple, les colonies de *Streptomyces sp.* dominaient la  
flore viable d'actinomycètes lorsqu'aucun traitement de lyse n'est  
appliqué (protocole n°1), et représentaient 65% du nombre total de  
colonies identifiées. Après broyage, le pourcentage de colonies de  
10 *Streptomyces* a diminué pour atteindre 51%, alors que la proportion de  
colonies appartenant au genre *Micromonospora* a augmenté de 14% à  
41%.

La lyse chimique/enzymatique (protocoles 5a et 5b) est  
apparue comme particulièrement efficace pour la lyse des  
15 streptomycètes. Lorsque tous les traitements de lyse ont été appliqués, y  
compris une lyse chimique/enzymatique (protocoles 5a et 5b), la  
microflore d'actinomycètes, qui comprenait encore plus de  $10^6$  CFU/g de  
sol, était dominée par les espèces appartenant au genre  
*Micromonospora*, alors qu'aucune ou très peu de colonies de  
20 *Streptomyces* ont été récupérées.

Les organismes appartenant aux genres tels que  
*Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Microbispora*, *Dactylosporangium* et  
*Actinoplanes* sont apparus sur les plaques en faible nombre (2-8% du  
nombre total de colonies identifiées) après broyage, homogénéisation  
25 avec le dispositif Ultraturrax, et sonication, mais étaient généralement  
absents lorsque ces traitements étaient combinés avec une lyse  
chimique/enzymatique.

Le nombre total de bactéries cultivables restant après chaque  
traitement de lyse (protocoles 2 à 5) a été aussi recherché pour le sol  
30 n°4. Les résultats indiquent que le nombre de bactéries cultivables ne  
décroît pas avec l'intensité des traitements de lyse (environ  $2 \times 10^6$   
CFU/g de sol dans tous les cas, et également lorsqu'un traitement n'est  
appliqué, tel que selon le protocole n°1).

L'obtention de ces faibles valeurs de CFU est probablement  
35 due au fait que du sol sec a été utilisé et que seules les bactéries les

plus résistantes se sont multipliées sur les plaques. Le nombre d'actinomycètes formant colonies était généralement plus grand que celui des CFU total (toutes les bactéries) du fait qu'une étape de germination de spores, comprise dans le protocole de détection des actinomycètes, manquait lors du contrôle des bactéries totales.

## 2.5 RECUPERATION DE L'ADN DU PHAGE LAMBDA AJOUTE:

Le but de ces expériences était d'estimer de quelle manière des traitements de lyse successifs pouvaient affecter la récupération d'ADN nu, et si ces traitements successifs de lyse contribuaient à sa dégradation.

L'ADN pouvait être soit une fraction d'ADN extracellulaire libérée à partir d'organismes déjà morts, qui peuvent persister dans le sol pendant des mois (WARD et al., 1990), soit de l'ADN libéré à partir d'organismes lysés facilement pendant les premières étapes du traitement. Afin de simuler cette situation, de l'ADN de phage lambda digéré par HindIII a été ajouté, à diverses concentrations, aux sols avant et après broyage. En plus du broyage, une combinaison des autres traitements de lyse a été testée, y compris la sonication (dispositif Cup Horn, voir protocole n°4b) et des chocs thermiques (voir la section Matériel et Méthodes).

Après extraction, des fractions aliquotes qui devraient théoriquement contenir de 25 à 150 ng d'ADN de phage lambda ont été analysées par électrophorèse sur gel. Aucun fragment d'ADN spécifique du phage lambda n'a pu être observé lorsque l'ADN a été inoculé dans les échantillons de sol préalablement au broyage, indépendamment de la dose ou du type de sol.

Lorsque l'ADN a été ajouté après broyage, et extrait sans étape de traitement de lyse additionnelle, les profils spécifiques d'ADN de phage lambda ont été détectés dans les extraits de quatre des cinq sols testés.

Dans tous ces cas, une relation directe de cause à effet a été obtenue entre la quantité d'ADN ajoutée et l'intensité des signaux sur les gels d'agarose. Les intensités des signaux étaient, cependant,

inférieures aux intensités de signaux attendues si on les compare à celles des standards moléculaires.

De plus, la bande à 23 kb était absente dans plusieurs cas, indiquant que les longs fragments étaient préférentiellement adsorbés aux particules du sol, ou étaient plus sensibles à la dégradation, comparés aux fragments courts.

Aucune bande n'a été détectée dans les échantillons de sol tropical n°5 qui est caractérisé par une très haute teneur en argile (tableau 1).

Pour une quantification plus précise, la récupération d'ADN a été déterminée sur un dispositif d'imagerie par phosphorescence (phospho-imager) après hybridation en tache (Dot Blot). Selon cette technique, l'ADN a été détecté dans tous les échantillons, y compris ceux qui avaient été inoculés avant broyage, à l'exception du sol n°5 dans lequel aucun ADN n'a pu être détecté.

Dans tous les autres sols, la quantité d'ADN extrait augmente avec l'augmentation de taille de l'inoculum (figures 4a-d).

Cependant, les récupérations d'ADN de phage lambda étaient faibles. Lorsque le broyage était le seul traitement de lyse appliqué, les récupérations étaient comprises entre 0,6 et 5,9% de l'ADN ajouté lorsque celui-ci était ajouté avant broyage, et de 3,6 à 24% de l'ADN ajouté lorsque ce dernier était ajouté après broyage. Les plus hauts niveaux de récupération ont été obtenus à partir du sol n°2.

L'électrophorèse sur gel de fractions aliquotes d'échantillons traités par choc thermique et sonication n'a permis d'observer des bandes d'ADN dans aucun des échantillons, y compris l'essai dans lequel l'ADN avait été ajouté après broyage. Les expériences d'hybridation en tache (Dot Blot) ont confirmé ces résultats.

Les signaux d'hybridation obtenus à partir de suspensions de sol qui ont été traitées par chocs thermiques et sonication ont été, tout au plus, faibles.

L'échantillon présentant la plus forte quantité d'ADN (15 µg d'ADN/g de poids sec du sol) était le seul pour lequel le signal obtenu était sensiblement différent du niveau du bruit de fond.

Aucune différence,( ou de faibles différences) n'a été observée entre les échantillons traités par choc thermique et ceux traités par chocs thermiques et sonication, indiquant que les chocs thermiques ont un effet préjudiciable sur l'ADN. Les récupérations les meilleures ont été observées pour le sol n°2, qui a la plus forte teneur en matière organique (tableau 1), alors qu'aucun ADN n'a été récupéré à partir du sol argileux n°5.

Des expériences additionnelles ont été réalisées avec des échantillons non broyés de sols n°4 et n°5, qui ont été ensemencés avec 20 et 50 µg d'ADN de phage lambda par gramme de sol.

Les échantillons ont été extraits immédiatement ou après une période d'incubation d'une heure à 28°C, puis les extraits d'ADN ont été purifiés et analysés par électrophorèse sur gel.

L'incubation du sol n°4 pendant une heure après l'inoculation n'a pas conduit à des profils qualitativement ou quantitativement différents de ceux obtenus sans incubation ou de ceux observés antérieurement lorsque l'ADN avait ajouté après broyage.

Ces résultats indiquent que la dégradation enzymatique par les nucléases du sol ne seraient pas impliquée dans le faible taux de récupération d'ADN. De plus, l'absence d'étape de broyage ne permet pas une augmentation de la récupération de l'ADN à partir du sol n°5, indiquant que les modifications de structure du sol dûes au broyage n'augmentent pas significativement l'adsorption des acides nucléiques sur les colloïdes.

## 2.6 SATURATION DES SITES D'ADSORPTION AVEC L'ARN:

La plupart des profils obtenus sur les gels d'agarose ne diffèrent pas significativement des profils précédents dans lesquels le traitement d'ARN n'a pas été effectué.

Par exemple, aucune bande n'a été détectée à partir du sol riche en argile n°5, indépendamment des concentrations d'ARN et des concentrations d'ADN de phage lambda utilisées.

De plus, les bandes spécifiques d'ADN de phage lambda digérées par HindIII restaient indétectables dans le terreau sablonneux traité par l'ARN (sol n°4) lorsque l'ARN est ajouté avant le broyage.

5 L'intensité des bandes obtenues à partir d'échantillons ensemencés avec l'ADN après broyage augmente avec la concentration d'ARN, indiquant que le traitement pourrait avoir un effet positif.

Cependant, les résultats après hybridation et analyse par imagerie à phosphorescence n'ont pas confirmé les résultats de l'électrophorèse. Par exemple, l'effet positif du traitement d'ARN sur la  
10 récupération d'ADN à partir du terreau argileux, lorsque l'ADN a été ajouté après broyage, n'apparaît pas clairement.

D'un autre côté, un effet positif de l'ARN a été trouvé pour le sol riche en argile (n°5) lorsque l'ADN a été ajouté après broyage.

Bien que les signaux d'hybridation pour les échantillons  
15 contrôle ne diffèrent pas des niveaux de bruit de fond, des quantités significatives d'ADN ont été libérées à partir des échantillons traités par l'ARN, et les signaux ont augmenté avec la quantité d'ADN ajoutée ainsi qu'avec la concentration d'ARN.

Cependant, même pour la plus forte concentration d'ARN (100  
20 mg/g de poids de sol sec) le taux de récupération n'a jamais dépassé 3%.

## 2.7 PURIFICATION DES EXTRAITS BRUTS D'ADN:

25 Des quatre protocoles testés, la meilleure amplification des extraits d'ADN non dilués (1 µl d'extrait dans 50 µl de mélange PCR) a été observée après l'élution à travers des colonnes de type Microspin S400 suivie d'une élution à travers une colonne de type Elutip d, comme le montre l'électrophorèse sur gel des produits PCR.

30 L'ADN purifié par le système aqueux double phase (protocole C) a donné des quantités plus faibles de produits PCR après amplification à partir d'extrait d'ADN non dilué.

Aucun produit d'amplification n'a pu être obtenu à partir des extraits non dilués après amplification à la suite de la mise en oeuvre  
35 des protocoles A ou B. En conséquence, le protocole B (voir section



Matériels et Méthodes) a été utilisé pour toutes les expériences dans lesquelles les amplifications PCR et/ou les hybridations sur tache (Dot Blot) ont été réalisées.

## 5 2.8 QUANTIFICATION PAR PCR ET HYBRIDATION:

La première étape était de déterminer si les quantités de produit PCR étaient proportionnelles au nombre de molécules d'ADN cibles initialement présentes dans le tube réactionnel. De l'ADN de  
10 *Streptosporangium fragile* a été utilisé comme cible (voir section Matériels et Méthodes).

Les amorces utilisées ont été les amorces FGPS122 et FGPS350 (tableau 2). L'électrophorèse sur gel des produits PCR a montré que l'intensité de bande augmente avec l'accroissement de la  
15 concentration des cibles. Les produits PCR ont été hybridés avec la sonde oligonucléotidique FGPS643 (tableau 2), et les signaux ont été quantifiés par imagerie par phosphorescence (phospho-imaging).

On a trouvé une bonne corrélation ( $r^2 = 0,98$ ) entre le log[nombre de cibles] et le log[intensité du signal d'hybridation].

On a ensuite recherché si l'efficacité de l'amplification PCR était affectée par les acides humiques et l'ADN non cible. Lorsqu'on l'analyse  
20 par électrophorèse sur gel, l'intensité accrue des bandes des produits PCR, correspondant aux différentes quantités d'ADN cible, était conservée lorsque l'amplification était réalisée avec des solutions d'ADN auxquelles on avait ajouté des extraits de sol traités à la DNase,  
25 contenant des acides humiques à des concentrations allant jusqu'à 8ng dans le mélange PCR d'un volume de 50  $\mu$ l.

Avec 20 ng d'acide humique dans le mélange PCR, les bandes correspondant aux faibles niveaux d'ADN cible ont disparu, et à des  
30 concentrations d'acide humique de 80 ng et à des concentrations supérieures, aucune bande n'était visible.

Les quantités variées d'ADN cible de *S.fragile* ont permis de fournir les quantités attendues de produit PCR lorsque, avant amplification, l'ADN de *S. fragile* a été mélangé avec de l'ADN de  
35 *Streptomyces hygroscopicus* et ajouté au mélange PCR de 50  $\mu$ l dans

une gamme de 100 pg à 1 µg afin de simuler l'ADN non-cible libéré à partir de la microflore du sol.

## 2.9 QUANTIFICATION DES ACTINOMYCETES INDIGENE DU SOL 5 APRES DIFFERENTS TRAITEMENTS DE LYSE:

On a appliqué le protocole de purification D suivi d'une amplification par PCR comme décrit ci-dessus afin de quantifier les actinomycètes appartenant au genre *Streptosporangium* dans le sol n°3 après  
10 extraction conformément aux protocoles n°1, 2, 3, 5a et 5b (figure 5).

Après broyage, (protocole n°2) la quantité d'ADN cible provenant de cet actinomycète a été estimée par hybridation (Dot Blot) et radio-imagerie comme étant de 2,5 +/- 1,3 ng /g de poids de sol sec.

Si l'on postule que le contenu en ADN est de 10 fg par cellule, comme pour *Streptomyces* (Gladek et al. 1984), cette valeur correspond  
15 à approximativement  $2,5 \times 10^5$  génomes. Des valeurs similaires ont été obtenues après les autres traitements de lyse (respectivement 2,6 +/-1,1 et 1,8 +/- 1,3 ng d'ADN/g de sol sec en utilisant respectivement les protocoles 3 et 4b).

20

## 2.10 EFFICACITE DE LA RECUPARATION D'ADN A PARTIR DE SOLS PREALABLEMENT INOCULES AVEC DES BACTERIES:

Trois sols (n°2, 3 et 5) ont été inoculés avec des spores ou des hyphae de *Streptomyces lividans* à différentes concentrations (voir section  
25 Matériel et Méthodes). Les quantités de mycélium ajoutées au sol (figure 6b) correspondent au nombre de spores inoculées dans le milieu de germination. Approximativement 50% de ces spores ont germé. Le nombre exact de cellules dans les hyphae des spores germinées n'a pas  
30 été déterminé. En conséquence, les quantités de spores et de mycélium ensemencées dans les sols ne sont pas directement comparables.

Pour chaque échantillon de sol, le protocole d'extraction n°6, la méthode de purification D, et l'amplification PCR combinée avec l'hybridation sur tache (Dot Blot) et l'imagerie par phosphorescence  
35 (phospho-imaging) ont été utilisés pour dénombrer les ADNs cibles

spécifiques qui avaient été libérés. L'ADN extrait peut être clairement distingué du bruit de fond seulement lorsque le nombre de spores ajoutées dépasse  $10^5$  pour les sols n°3 et n°5 et  $10^7$  pour le sol n°2 (figure 6a).

5 Lorsque le mycélium est ajouté, l'ADN extrait peut être détecté au-delà d'une quantité correspondant à  $10^3$  spores/g de sol pour les sols n°2 et n°3, et au-delà de  $10^7$  spores/g pour le sol n°5 (figure b).

Au-dessus du niveau de détection, le signal d'hybridation augmente avec des quantités croissantes des cellules inoculées.

10 Pour l'inoculum de spores, une augmentation de 100 fois dans le nombre de cellulesensemencées conduit à une augmentation de presque 100 du rendement d'ADN. Cette augmentation est clairement inférieure lorsque les hyphae sont inoculées, particulièrement dans les sols n°2 et n°3 (figure 6).

15 Au contraire, les résultats obtenus lorsque l'ADN de phage lambda a été utilisé comme inoculum, l'ADN a également été récupéré à partir du sol riche en argile (n°5) lorsque les cellules bactériennes ont été utilisées comme inoculum. Cependant, pour ce dernier aussi, le traitement par l'ARN a augmenté la récupération d'ADN de  
20 *Streptomyces* à partir de ce sol à la fois pour les spores et le mycélium (figure 6).

Le fait d'ensemencer des sols avec des cellules végétatives de *Bacillus anthracis* a fourni des taux de récupération similaires à ceux obtenus pour *Streptomyces*.

25 De plus, les taux de récupération d'ADN à partir du sol n°5 ont augmenté après traitement par l'ARN également pour cet inoculum.

**Exemple 2 : Construction d'une banque d'ADN de faible poids moléculaire (<10 kb) à partir d'un sol contaminé par du lindane :  
30 clonage et expression du gène *linA***

Cet exemple décrit la construction d'une librairie d'ADN du sol dans *E. coli*. Il permet de démontrer le clonage et l'expression de gènes de petite taille issus d'une microflore non cultivable .

35

Le lindane est un pesticide organochloré, récalcitrant à la dégradation et persistant dans l'environnement. En aérobie, sa biodégradation est catalysée par une déhydrochlorinase, codée par le gène *linA*, permettant de transformer le lindane en 1,2,4-trichlorobenzène. Le gène *linA* n'a été identifié que parmi deux souches isolées du sol : *Sphingomonas paucimobilis*, isolé au Japon (Seeno et Wada 1989, Imai *et al* 1991, Nagata *et al* 1993) et *Rhodanobacter lindaniclasticus* isolé en France (Thomas *et al* 1996, Nalin *et al* 1999).

Pourtant le potentiel de dégradation du lindane, mis en évidence par dosage des ions chlorures libérés et amplification par PCR du gène *linA* à partir de sols ayant été en contact ou non avec du lindane, semble être répandu plus largement dans l'environnement (Biesiekierska-Galguen, 1997).

#### 1. Extraction directe d'ADN de sol

Les sols secs sont broyé pendant 10 minutes dans un broyeur à force centrifuge Restch équipé 6 billes de tungstène. 10 grammes de sol broyé sont mis en suspension dans 50 ml de tampon TENP pH 9 (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 100 mM, polyvinylpyrrolidone 1% w/v), et homogénéisés au vortex pendant 10 min.

Après centrifugation de 5 minutes, 4000 g à 4°C, le surnageant est précipité à l'acétate de sodium (3M, pH 5.2) et à l'isopropanol, pour être repris dans du tampon TE stérile (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). L'ADN extrait est ensuite purifié sur colonne de tamisage moléculaire S400 (Pharmacia) et sur colonne échangeuse d'ions Elutip d (Schleicher et Schuell), selon les instructions des fabricants, puis conservé dans du TE.

#### 2. Construction de la banque d'ADN extrait du sol dans le vecteur pBluescript SK-

Le vecteur pBluescript SK- et l'ADN extrait du sol sont chacun digérés par les enzymes *HindIII* et *BamHI* (Roche), à raison de 10 unités d'enzymes pour 1 µg d'ADN (incubation 2 heures à 37°C). Les ADN sont

ensuite ligués par action de la T4 DNA ligase (Roche), une nuit à 15°C, à raison d'une unité d'enzyme pour 300 ng d'ADN (environ 200 ng d'ADN insert et 100 ng de vecteur digéré). Les cellules d'*Escherichia coli* électrocompétentes, ElectroMAX DH10B <sup>TM</sup> (Gibco BRL) sont transformées par le mélange de ligation (2 µl) par électroporation (25 µF, 200 et 500 Ω, 2,5 kV) (Biorad Gene Pulser).

Après une heure d'incubation dans le milieu LB, les cellules transformées sont diluées de façon à obtenir environ 100 colonies par boîte puis sont étalées sur milieu LB (10 g/l Tryptone, 5 g/l extrait de levure, 5 g/ NaCl) additionné d'Ampiciline (100 mg/l), de γ-HCH (500 mg/l), de X-gal 60 mg/l (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactoside), et d'IPTG 40 mg/l (isopropylthio-β-D-galactoside), et incubées une nuit à 37°C. Le γ-hexachlorocyclohexane (Merck-Schuchardt) étant insoluble dans l'eau, une solution à 50 g/l est préparée dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) (Sigma).

Une banque de 10 000 clones a ainsi été obtenue.

### 3. Clonage et expression du gène *linA*

Le criblage de la banque s'effectue par visualisation d'un halo de dégradation du lindane autour de la colonie (le lindane précipitant dans les milieux de culture). Sur 10 000 clones criblés, 35 présentaient ainsi une activité de dégradation du lindane. La présence du gène *linA* chez ces clones a pu être confirmée par PCR grâce à des amorces spécifiques, décrites par Thomas et al (1996). Des digestions réalisées sur les inserts ainsi que sur les produits d'amplification ont montré des profils identiques entre tous les clones criblés et le témoin de référence, *R. lindaniclasticus*. Les clones portant le gène *linA* présentaient également un insert de même taille (environ 4 kb).

Il a ainsi pu être démontré que l'ADN du sol pouvait être cloné et exprimé chez un hôte hétérologue : *E. coli*, et que des gènes issus d'une microflore difficilement cultivable pouvaient être exprimés. Des banques réalisées à partir de digestion partielle d'ADN extrait du sol par des enzymes de restriction telles que *Sau3AI* sont donc aussi envisageables.

**EXEMPLE 3:****Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol, comprenant une étape d'extraction indirecte de l'ADN.****1. MATERIEL ET METHODES.****1.1 Extraction de la fraction bactérienne du sol.**

5g de sol sont dispersés dans 50 ml de NaCl 0.8% stérile, par broyage au Waring Blender pendant 3 x 1 minute, avec refroidissement dans la glace entre chaque broyage. les cellules bactériennes sont alors séparées des particules du sol par centrifugation sur un coussin de densité de Nycodenz (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norvège). Dans un tube à centrifugation, 11,6 ml d'une solution de Nycodenz de densité de 1.3 g.ml<sup>-1</sup> (8g de Nycodenz suspendu dans 10 ml d'eau stérile) sont placés en dessous de 25 ml de la suspension de sol précédemment obtenue. Après centrifugation à 10.000 g dans un rotor à godets mobiles (rotor TST 28.38, Kontron) pendant 40 minutes à 4°C, l'anneau cellulaire, se situant à l'interphase de la phase aqueuse et de la phase Nycodenz, est prélevé, lavé dans 25 ml d'eau stérile et centrifugé à 10.000 g pendant 20 minutes. Le culot cellulaire est ensuite repris dans une solution Tris 10 mM; EDTA 100 mMn pH 8.0.

Préalablement à la dispersion du sol au Waring Blender, une étape d'enrichissement du sol dans une solution d'extrait de levure peut être incluse afin de permettre notamment la germination des spores bactériennes du sol. 5 g de sol sont alors incubés dans 50 ml d'une solution stérile de NaCl 0.8% - extrait de levure 6%, pendant 30 minutes à 40°C. L'extrait de levure est éliminé par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes afin d'éviter la formation de mousse durant le broyage.

**1.2 Lyse des cellules bactériennes du sol.**

- *Lyse des cellules en milieu liquide et purification sur gradient de chlorure de césium.*

Les cellules sont lysées dans une solution Tris 10 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0 contenant 5 mg.ml<sup>-1</sup> de lysozyme et 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> d'achromopeptidase pendant 1 heure à 37°C . Une solution de lauryl  
5 sarcosyl (1% final) et de protéinase K (2 mg.ml<sup>-1</sup>) est ensuite ajoutée et incubée à 37°C pendant 30 minutes. La solution d'ADN est alors purifiée sur un gradient de densité de chlorure de césium par centrifugation à 35 000 rpm pendant 36 heures sur un rotor Kontron 65.13. Le gradient de  
10 chlorure de césium employé est un gradient à 1g/ml de CsCl, possédant un indice de réfraction de 1,3860 (Sambrook et al., 1989).

- *Lyse des cellules après inclusion dans un bloc d'agarose.*

Les cellules sont mélangées à un volume égal d'agarose à 1.5% (poids/volume) Seaplaque (Agarose Seaplaque FMC Products.  
15 TEBU, Le Perray en Yvelines, France). à bas point de fusion et coulées dans un bloc de 100 µl. Les blocs sont ensuite incubés dans une solution de lyse : EDTA 250 mM, saccharose 10.3%, lysozyme 5 mg.ml<sup>-1</sup> et achromopeptidase 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> à 37°C pendant 3 heures. Les blocs sont alors lavés dans une solution de Tris 10 mM - EDTA 500 mM et  
20 incubés une nuit à 37°C dans de l'EDTA 500 mM contenant 1 mg.ml<sup>-1</sup> de protéinase K et du lauryl sarcosyl 1%. Après plusieurs lavages dans du Tris-EDTA, les blocs sont conservés dans de l'EDTA 500 mM.

La qualité des ADN ainsi extraits est contrôlée par électrophorèse en champs pulsés.

25 La quantité d'ADN extrait a été évaluée sur gel d'électrophorèse par rapport à une gamme étalon d'ADN de thymus de veau.

### **1.3 Caractérisation moléculaire de l'ADN extrait du sol.**

30 Les ADN extraits du sol sont caractérisés par hybridation PCR, méthode qui consiste à amplifier dans un premier temps les ADNs à l'aide d'amorces situées sur des régions universellement conservées du gène de l'ARNr16S, puis à hybrider les ADNs amplifiés avec différentes sondes oligonucléotidiques de spécificité connue (tableau 4), dans le but

de quantifier l'intensité du signal d'hybridation par rapport à une gamme étalon externe d'ADN génomique.

Les ADN extraits du sol ainsi que les ADN génomiques extraits de cultures pures sont amplifiés avec les amorces FGPS 612-669 (tableau 1) dans les conditions standard d'amplification par PCR. Les produits d'amplification sont ensuite dénaturés par un volume égal de NaOH 1N, déposés sur une membrane de Nylon (GeneScreen Plus, Life Science Products) et hybridés avec une sonde oligonucléotidique marquée à son extrémité par du  $g^{32}P$  ATP par action de la T4 polynucléotide kinase. Après préhybridation de la membrane dans une solution de 20 ml contenant 6 ml de SSC 20X, 1 ml de solution de Denhardt, 1 ml de SDS 10% et 5 mg d'ADN hétérologue de sperme de saumon, les hybridations sont conduites durant une nuit à la température définie par la sonde. Les membranes sont lavées deux fois dans du SSC 2X pendant 5 minutes à température ambiante, puis une fois dans du SSC 2X SDS 0,1% et une seconde fois dans du SSC 1X, SDS 0,1% pendant 30 minutes à la température d'hybridation. Les signaux d'hybridation sont quantifiés à l'aide du logiciel Molecular Analyst (Biorad, Ivry sur Seine, France) et les quantités d'ADN sont estimées par interpolation des courbes étalons obtenues à partir des ADN génomiques.

## **2. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **2.1 Extraction et lyse de la fraction bactérienne du sol.**

La séparation des cellules microbiennes des particules du sol, préalablement à l'extraction de l'ADN, est une alternative présentant de nombreux avantages par rapport aux méthodes d'extraction directe de l'ADN dans le sol. En effet, l'extraction de la fraction microbienne limite la contamination de l'extrait d'ADN par de l'ADN extracellulaire présent librement dans le sol ou par de l'ADN d'origine eucaryote. Mais surtout, l'ADN extrait de la fraction microbienne du sol présente des fragments de plus longue taille et une meilleure intégrité que l'ADN extrait par lyse directe JACOBSON et RASMUSSEN (1992). De plus, la séparation des



particules de sol permet d'éviter une contamination de l'extrait d'ADN par des composés humiques et phénoliques, composés pouvant, par la suite, nuire gravement aux efficacités de clonage.

Une des étapes déterminantes pour l'extraction des cellules du sol est la dispersion de l'échantillon de sol afin de dissocier les cellules adhérent à la surface ou à l'intérieur des agrégats de particules de sol. Trois cycles de broyage successifs d'une minute chacun permettent d'obtenir une meilleure efficacité d'extraction des cellules ainsi qu'une plus grande quantité d'ADN récupéré, par rapport à un unique cycle de broyage d'une minute 30.

Le tableau 5 rapporte les efficacités d'extraction obtenues après centrifugation sur gradient de Nycodenz, sur la microflore totale viable (dénombree par microscopie après coloration à l'acridine orange), sur la microflore totale cultivable (dénombree sur milieu solide Trypticase-Soja 10%), et sur la microflore d'actinomycètes cultivables sur milieu HV agar (après incubation à 40°C dans une solution d'extrait de levure 6% -SDS 0,05% afin de provoquer la germination des spores). D'autre part, l'ADN extrait a été quantifié soit après une lyse des cellules en milieu liquide (sans purification sur gradient de chlorure de césium) soit après une lyse des cellules incluses dans un bloc d'agarose (après digestion de l'agarose par une b-agarase).

Les résultats montrent que plus de 14% de la microflore tellurique totale est récupéré par cette méthode (soit  $2 \cdot 10^8$  cellules par gramme de sol), et que la microflore totale cultivable ne représente qu'à peine 2% de la population microbienne totale.

D'autre part, la quantité d'ADN extrait des cellules est de 330 ng par gramme de sol sec. En estimant le contenu d'ADN par cellule microbienne du sol entre 1.6 et 2.4 fg, et compte tenu de la quantité de cellules extraites ( $2 \cdot 10^8$  cellules par gramme de sol), on peut estimer que la quasi-totalité des cellules ont été lysées et qu'ainsi la lyse n'apporte pas d'important biais à cette approche.

Les électrophorèses en champs pulsés ont montré que l'ADN du sol extrait après gradient de Nycodenz et de CsCl pouvait atteindre une taille de 150 kb et que la lyse en bloc d'agarose permettait d'extraire des fragments supérieurs à 600kb.

Ces résultats confirment l'intérêt de cette approche indépendante de la culture pour la construction de banques d'ADN de l'environnement, en se présentant comme une alternative aux méthodes directes d'extraction d'ADN.

5

## **2.2 Caractérisation moléculaire de l'ADN extrait du sol.**

Le but de la caractérisation moléculaire de l'ADN extrait du sol est d'obtenir des profils représentant les proportions des différents taxons bactériens présents dans l'extrait d'ADN. Il s'agissait également de connaître les biais d'extraction induits par la séparation préalable de la réaction cellulaire du sol, en comparaison avec une méthode d'extraction directe faute de visualisation directe de la diversité microbienne présente dans les sols. En effet, peu d'informations ont été rassemblées sur l'extraction des cellules sur gradient de Nycodenz en fonction de leur structure morphologique (diamètre des cellules, formes filamenteuses ou sporulées).

Les méthodes jusqu'ici en place étaient basées sur des:

- hybridations quantitatives utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques à différents groupes bactériens, appliqués directement d'ADN extrait de l'environnement. Malheureusement, cette approche n'est pas très sensible et ne permet pas de détecter des genres ou des groupes taxonomiques présents en faible abondance AMANN (1995).

- PCR quantitatives telles que la MPN-PCR (Most Probable Number) SYKES et al. (1992) ou la PCR quantitative par compétition DIVIACCO et al. (1993). Les inconvénients respectifs de chacune de ces approches sont (i) la lourdeur d'utilisation du fait de la multiplication des dilutions et des répétitions qui rend la technique inappropriée pour un grand nombre d'échantillons ou de couples d'amorces, et (ii) la nécessité de construire un compétiteur spécifique à l'ADN cible et n'induisant pas de biais dans la compétition.

La méthode mise en place selon la présente invention consiste à amplifier universellement un fragment de 700 pb à l'intérieur de la séquence d'ADNr 16S, à hybrider cet amplifiat avec une sonde

oligonucléotidique de spécificité variable (au niveau du règne, de l'ordre, de la sous classe ou du genre) et à comparer l'intensité d'hybridation de l'échantillon par rapport à une gamme étalon externe. L'amplification préalable à l'hybridation permet de quantifier des genres ou des espèces de micro-organismes peu abondants. De plus, l'amplification par des amorces universelles permet, lors de l'hybridation, d'utiliser une large série de sondes oligonucléotidiques. Elle permet de comparer entre eux différents modes de lyse (extraction directe ou indirecte) sur des groupes taxonomiques bien définis.

10 Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

Ils montrent des profils similaires entre les deux méthodes d'extraction (directe et indirecte). Ainsi, il apparaît que l'extraction préalable de la fraction microbienne tellurique n'introduit pas de réels biais parmi les taxons testés. La seule différence significative entre les deux approches d'extraction semblerait être la plus grande abondance de séquences d'ADNr appartenant aux  $\gamma$  protéobactéries dans l'extrait par la méthode d'extraction indirecte.

De plus, un effet significatif de l'incubation de l'échantillon de sol dans une solution d'extrait de levure est observé sur les populations sporulées du sol (Gram<sup>+</sup>, bas pourcentage de GC et Actinomycètes). Cette étape provoque la germination des spores, et permet d'une part certainement une meilleure récupération de ce type de cellules et d'autre part une plus grande efficacité de la lyse sur des cellules en germination.

Cette approche permet une analyse semi-quantitative, ciblée sur les principaux taxons définis à partir de micro-organismes cultivés et habituellement retrouvés dans les sols. Seuls des outils moléculaires permettent d'estimer l'importance des différents taxons, les méthodes de mise en culture étant trop restrictives et dépendantes de la spécificité du milieu utilisé.

30 Les résultats montrent qu'une grande part de la population microbienne n'est pas représentée dans les groupes phylogénétiques décrits, mettant ainsi en évidence l'existence de nouveaux groupes composés de micro-organismes non cultivés jusqu'à présent, ou non cultivables.

Ainsi, de nouvelles sondes peuvent être définies à partir de séquences déterminées à partir d'ADN extrait du sol (nouveaux phylums composés de micro-organismes non cultivés, LUDWIG et al. (1997) afin d'obtenir une image plus exacte de la composition de l'extrait d'ADN.

5

#### **Exemple 4 : - CONSTRUCTION DU COSMIDE POS 700I**

##### **Caractéristiques de POS 700I:**

- Réplicatif chez *E. coli*  
10 Intégratif chez *Streptomyces*  
Sélectionnable chez *E. coli* AmpR, HygroR et *Streptomyces* HygroR

Les propriétés du cosmide permettent d'insérer de grands fragments d'ADN entre 30 et 40kb.

15 Il comprend

- 1 - Le promoteur inductible *tipA* de *Streptomyces lividans*
- 2 - Le système d'intégration spécifique de l'élément pSAM2
- 3 - Le gène de résistance à l'hygromycine
- 4- le cosmide pWED1, dérivé de pWED15

20

##### **1) - Le promoteur inductible du gène *tip A* de *S. lividans***

Le gène *tipA* code une protéine de 19 KD dont la transcription est induite par l'antibiotique thiostrepton ou nosiheptide. Le promoteur de  
25 *tipA* est bien régulé: induction en phase exponentielle et en phase stationnaire (200X) Murakami T, Holt TG, Thompson CJ. J. Bacteriol 1989 ;171 :1459-66

##### **2) - Le gène de résistance à l'hygromycine**

30

- Hygromycine: antibiotique produit par *S. hygroscopicus*
- Le gène de résistance code une phosphotransférase (*hph*)
- Le gène utilisé provient d'une cassette construite par Blondelet et al dans laquelle le gène *hyg* est sous contrôle de son propre promoteur

et du promoteur plac inductible par l'IPTG Blondelet-Rouault et al ; .  
Gene 1997 ;190 :315-7

### 3) - Le système d'intégration site-spécifique

5

L'élément pSAM2 s'intègre dans le chromosome par un mécanisme d'intégration site-spécifique. La recombinaison a lieu entre deux séquences identiques de 58 pb présentes sur le plasmide (*attP*) et sur le chromosome (*attB*).

10 Le gène *int*, situé à proximité du site *attP*, est impliqué dans l'intégration site-spécifique de pSAM2, et son produit présente des similitudes avec les intégrases des bactériophages tempérés d'entérobactéries. Il a été démontré qu'un fragment de pSAM2 ne contenant que le site d'attachement *attP* ainsi que le gène *int* était  
15 capable de s'intégrer de la même manière que l'élément entier. Voir brevet français n°88 06638 du 18/05/1988, ainsi que Raynal A et al. Mol Microbiol 1998 28 :333-42).

### 4) - Construction du cosmide pOS700I

20

**Etape 1/** Le promoteur TipA a été isolé du plasmide pPM927 (Smokvina et al. Gene 1990; 94:53-9 ) sur un fragment HindIII-BamHI de 700 paires de bases et cloné dans le vecteur pUC18 (Yannish-Perron et al., 1985) digéré par HindIII/BamHI

25

**Etape 2/** Ce fragment HindIII-BamHI a ultérieurement été transféré de pUC18 à pUC19 (Yannish-Perron et al., 1985).

30

**Etape 3/** Un insert BamHI-BamHI de 1500 paires de bases portant le gène *int* et le site *attP* de pSAM2 a été isolé du plasmide pOSint1, représenté à la Figure 8, (Raynal A et al. Mol Microbiol 1998 28 :333-42) et cloné au site BamHI du vecteur précédent (pUC19/TipA), dans l'orientation permettant de mettre le gène *int* sous contrôle du promoteur TipA.

35

**Etape 4/** Le site BamHI situé en 5' du gène int a été supprimé par digestion partielle BamHI puis traitement par l'enzyme Klenow. Un fragment HindIII-BamHI portant TipA-int-attP a ainsi été isolé de pUC19 et transféré dans pBR322 HindIII/BamHI.

5

**Etape 5/** La cassette Hygromycine isolée de pHP45 $\Omega$ hyg (Blondelet-Rouault et al., 1997) sur un fragment HindIII-HindIII a été clonée au site HindIII situé en amont du promoteur TipA.

10 **Etape 6/** Le site HindIII situé entre la cassette  $\Omega$ Hyg et le promoteur TipA a été supprimé par traitement Klenow après digestion partielle HindIII.

15 **Etape 7/** Le plasmide obtenu à l'issue de l'étape précédente permet d'isoler un fragment unique HindIII-BamHI, portant tous les éléments  $\Omega$ Hyg/TipA/int attP, qui a été cloné après traitement Klenow au site EcoRV du cosmide pWED1. Le cosmide pWED1, représenté à la Figure 9, dérive du cosmide pWE15, représenté à la Figure 10 (Wahl GM, et al. . Proc Natl Acad Sci U S A 1987 84:2160-4) par délétion d'un fragment  
20 HpaI-HpaI portant le gène Neomycine et l'origine SV40.

Une carte du vecteur pOS 700I est représentée à la Figure 11.

25 **Exemple 5 : Construction de plusieurs cosmides conjugatifs et intégratifs chez *Streptomyces*, les vecteur pOSV 303, pOSV306 et pOSV307**

### **5.1 Construction du vecteur pOSV303.**

30 Etant donné que l'emballage sélectionne les clones ayant une taille supérieure à 30kb, seuls 10 à 15% des clones ne contiennent pas d'insert, il n'est donc pas vraiment nécessaire d'avoir un système de sélection des recombinants, ce qui permet de construire un vecteur plus petit.

35

**Construction:****Etape 1 : le vecteur pOSV001**

Clonage d'un fragment PstI-PstI de 800 paires de bases portant l'origine de transfert OriT du réplicon RK2 (Guiney et al., 1983), dans le  
5 plasmide pUC19 ouvert par PstI. Cette étape de clonage permet d'obtenir un vecteur transférable de *E. coli* à *Streptomyces* par conjugaison.

La carte du vecteur pOSV 001 est représentée à la Figure 17.

**10 Etape 2 : le vecteur pOSV002**

Insertion du marqueur Hygromycine (cassette  $\Omega$ hyg), et sélectionnable chez *Streptomyces*, de sorte que le gène conférant la résistance à l'hygromycine soit transféré en dernier ce qui permet de s'assurer du transfert complet du BAC avec l'insert d'ADN du sol.

15 Clonage de la cassette Hygromycine isolée de pHP45 $\Omega$ hyg sur un fragment HindIII-HindIII portant le gène de résistance à l'Hygromycine.. Ce fragment est cloné au site PstI (position 201) du vecteur pOSV001. Ce site PstI a été choisi, compte tenu du sens du transfert, pour que le marqueur Hygro soit le dernier transféré lors de la conjugaison. Les  
20 extrémités PstI et HindIII sont rendues compatibles après traitement par le fragment Klenow de l'ADN polymérase permettant de générer des "bouts francs". L'orientation du fragment  $\Omega$ hyg est déterminée en fin de construction.

La carte du vecteur pOSV002 est représentée à la Figure 18.

25

**Etape 3 : le vecteur pOSV010**

Le fragment XbaI-HindIII isolé du plasmide pOSV002 et contenant le marqueur de résistance à l'hygromycine et l'origine de transfert est cloné dans le plasmide pOSint1 digéré par XbaI et HindIII.  
30 L'orientaion des sites est telle que le marqueur hygromycine sera toujours transféré en dernier.

Le plasmide pOSint1, représenté à la Figure 8, a été décrit dans l'article de Raynal et al. ( Raynal A et al. Mol Microbiol 1998 **28** :333-42).

Cette construction permet l'expression de l'intégrase chez *E.*  
35 *coli* et chez *Streptomyces*.

**Etape 4 : insertion du site " cos "**

Le principe est d'insérer un site " cos " dans le plasmide pOSV010 permettant l'empaquetage dans le plasmide pOSV010, représenté à la Figure 12.

L'obtention du fragment " cos " est représentée à la Figure 13.

Ce fragment est obtenu par PCR. A partir d'un fragment portant les extrémités cohésives (cos) de  $\lambda$  (bactériophage lambda ou cosmide pHc79), une amplification par PCR est réalisée à l'aide des oligonucléotides correspondant aux séquences -50/+130 par rapport au site cos. Ces oligonucléotides contiennent en outre les sites de clonage NsiI, compatible PstI, XhoI, compatible Sall, EcoRV, " bout franc ".

L'addition des sites rares SwaI et PaeI permet d'isoler et/ou de cartographier l'insert cloné.

Le fragment PCR est borné par un site PstI à l'extrémité 5' et par un site HincII à l'extrémité 3', permettant le clonage dans le vecteur pOSV010 (Figure 12) préalablement digéré par les enzymes NsiI et EcoRV, provoquant la délétion du répresseur lacIq.

La carte du vecteur pOSV303 est représentée sur la Figure 14. Le vecteur pOSV303, contient des sites de clonage tels que le site NsiI, compatible PstI, le site XhoI, compatible Sall ou encore le site EcoRV pour l'obtention de " bouts francs ".

**5.2 Construction du vecteur pOSV306****Etape 1: Construction du vecteur pOSV308.**

Le vecteur pOSV308 a été construit selon le procédé illustré à la figure 27. Un fragment de 643 pb contenant la région cos a été amplifié à l'aide du couple d'amorces de séquences SEQ ID N°107 et SEQ ID N°108 à partir du vecteur cosmide pHc79 décrit par HOHM B and COLLINS (1980).



Ce fragment nucléotidique amplifié a été cloné directement dans le vecteur pGEMT-easy commercialisé par la Société PROMEGA, comme illustré à la figure 27 afin de produire le vecteur pOSV308.

5                    **Etape 2: Construction du vecteur pOSV306.**

Le vecteur pOSV010 a été construit comme décrit à l'étape 3 de construction du vecteur pOSV303, comme décrit au paragraphe 5.1 du présent exemple.

10                    Le vecteur pOSV10 a été digéré par les enzymes EcoRV et NsiI afin d'exciser un fragment de 7874 pb qui a été ultérieurement purifié, comme cela est illustré à la figure 28.

Puis, le vecteur pOSV308 obtenu à l'étape 1) ci-dessus a été soumis à une digestion par les enzymes EcoRV et PstI afin d'exciser un  
15 fragment de 617 pb, qui a été ultérieurement purifié.

Puis, le fragment cos de 617 pb obtenu à partir du vecteur pOSV308 a été intégré par ligation dans le vecteur pOSV10, afin d'obtenir le vecteur pOSV306, comme cela est illustré à la figure 28.

20                    **5.3 Construction du vecteur pOSV307.**

Le cosmide pOSV307 contient toujours le gène LacIq, afin d'améliorer la stabilité du cosmide dans *Streptomyces*, par exemple dans la souche S17-1 de *Streptomyces*.

25                    Afin de construire le vecteur pOSV307, on a soumis le vecteur pOSV010 à une digestion par l'enzyme PvuII, pour obtenir un fragment de 8761 pb qui a été purifié, puis déphosphorylé.

Ensuite, le vecteur pOSV308, tel qu'obtenu comme décrit à l'étape 1) du paragraphe 5.2 ci-dessus, a été digéré par l'enzyme EcoRI  
30 afin d'obtenir un fragment de 663 pb, qui a été ensuite purifié et traité par l'enzyme de Klenow.

Le fragment nucléotidique ainsi traité a été intégré dans le vecteur pOSV010 après ligation afin d'obtenir le vecteur pOSV307, comme illustré à la figure 29.

35

**Exemple 6 : - Construction du cosmide réplcatif navette *E. coli*-*Streptomyces* pOS700R.**

Les fragments du plasmide pEI16 (Volff et al., 1996) représenté  
5 à la Figure 15 ont été isolés et traités par Klenow. Ces fragments  
contiennent les séquences nécessaires à la replication et à la stabilité  
provenant du plasmide SCP2.

Ces deux fragment sont insérés séparément dans le site  
EcoRV du cosmide pWED1 conduisant à 2 clones différents.

10 La cassette Hygromycine isolée de pHP45Ωhyg sur un  
fragment HindIII-HindIII a été clonée au site HindIII des cosmides  
pWED1 contenant l'insert ScP2 sous forme de fragments PstI-EcoRI ou  
XbaI. Elle confère une résistance à l'Hygromycine sélectionnable à la  
fois chez *E. coli* et chez *Streptomyces*.

15 Transformation de *S. lividans* et détermination de l'efficacité de  
transformation.

Il est apparu que le cosmide contenant l'insert XbaI était moins  
stable que celui contenant le fragment PstI EcoRI. C'est donc ce dernier  
qui a été retenu sous le nom de pOS700R.

20 La carte du vecteur pOS 700R est représentée sur la Figure 16.

**Exemple 7: Efficacité de transformation des vecteurs intégratifs  
(pOS700I) et réplcatifs**

25 **Possibilités**

Rendre la souche de *S. lividans* résistante au thiostrepton par  
intégration du plasmide pTO1 portant le marqueur de résistance au  
thiostrepton

30 Préparation de protoplastes à partir de *S. lividans* cultivée en  
présence de thiostrepton

Avec le vecteur pOS700I, l'efficacité de transformation est  
d'environ 3000 transformants par µg d'ADN.

Avec le vecteur pOS700R, l'efficacité de transformation est  
d'environ 30 000 transformants par µg d'ADN.

35

### **Exemple 8 : Construction d'un vecteur BAC intégratif chez *Streptomyces* et conjugatif**

#### **Caractéristiques:**

5

Réplicatif chez *E. coli*

Transférable par conjugaison de *E. coli* aux *Streptomyces*

Intégratif chez *Streptomyces*

Sélectionnable chez *E. coli* et *Streptomyces*

- 10 Capable d'insérer de grands fragments d'ADN ; il faut souligner qu'il est nécessaire de disposer d'ADN du sol dont la taille est comprise entre 100 et 300kb et non contaminé par des petits fragments. En effet les petits fragments sont très préférentiellement intégrés.

- 15 Doté d'un crible permettant de sélectionner les plasmides portant un insert. Ce crible permet en éliminant les vecteurs refermés sur eux même et non digérés de travailler avec un rapport plus élevé entre vecteur et DNA à insérer ce qui permet d'avoir une meilleure efficacité de clonage pour constituer des banques.

#### 20 **Construction:**

##### **Etape 1 : le vecteur pOSV001**

- 25 Clonage d'un fragment PstI-PstI de 800 paires de bases portant l'origine de transfert OriT du réplicon RK2 (Guiney et al., 1983), dans le plasmide pUC19 ouvert par PstI. Cette étape de clonage permet d'obtenir un vecteur transférable de *E. coli* à *Streptomyces* par conjugaison.

La carte du vecteur pOSV 001 est représentée à la Figure 17.

30

##### **Etape 2 : le vecteur pOSV002**

Insertion du marqueur Hygromycine (cassette  $\Omega$ hyg), et sélectionnable chez *Streptomyces*, de sorte que le gène conférant la

résistance à l'hygromycine soit transféré en dernier ce qui permet de s'assurer du transfert complet du BAC avec l'insert d'ADN du sol.

Clonage de la cassette Hygromycine isolée de pHP45Ωhyg sur un fragment HindIII-HindIII portant le gène de résistance à l'Hygromycine..

5 Ce fragment est cloné au site PstI (position 201) du vecteur pOSV001. Ce site PstI a été choisi, compte tenu du sens du transfert, pour que le marqueur Hygro soit le dernier transféré lors de la conjugaison. Les extrémités PstI et HindIII sont rendues compatibles après traitement par le fragment Klenow de l'ADN polymérase permettant de générer des  
10 "bouts francs". L'orientation du fragment Ωhyg est déterminée en fin de construction.

La carte du vecteur pOSV002 est représentée à la Figure 18.

### **Etape 3 : le vecteur pOSV010**

15

Le fragment XbaI-HindIII isolé du plasmide pOSV002 et contenant le marqueur de résistance à l'hygromycine et l'origine de transfert est cloné dans le plasmide pOSint1 digéré par XbaI et HindIII. L'orientation des sites est telle que le marqueur hygromycine sera  
20 toujours transféré en dernier.

Le plasmide pOSint1, représenté à la Figure 8, a été décrit dans l'article de Raynal et al.( Raynal A et al. Mol Microbiol 1998 28 :333-42).

25

Cette construction permet l'expression de l'intégrase chez *E. coli* et chez *Streptomyces*.

### **Etape 4 : le vecteur pOSV014**

30

Addition d'une "cassette" permettant à terme de sélectionner dans la construction finale les plasmides ayant insérés de l'ADN étranger.

Cette "cassette" porte le gène codant pour le répresseur CI du phage λ et le gène conférant la résistance à la tétracycline. Ce gène porte dans  
35 sa région 5' non codante la séquence cible du répresseur. L'insertion

d'ADN dans le site HindIII situé dans la séquence codante de CI conduit à la non production du répresseur et donc à l'expression de la résistance à la tétracycline.

Elle est portée par le plasmide pUN99 décrit dans l'article : Nilsson et al .

5 (Nucleic Acids Res 1983, 11:8019-30)

Un fragment PvuII-HindIII isolé de pOSV010 et contenant les séquences Int, attP, Hygro et oriT est cloné au site MscI de pUN99 .

La carte du vecteur pOSV014 est représentée sur la Figure 19.

#### 10 **Etape 5 : le vecteur pOSV 403, vecteur BAC intégratif et conjugatif**

Cette dernière étape de clonage dans pBAC11 (représenté à la Figure. 20) permet de conférer au plasmide final des caractéristiques de BAC (Bacterial Artificial Chromosome), en particulier l'aptitude à  
15 accepter des inserts d'ADN de très grande taille.

Le fragment PstI-PstI du vecteur pOSV014 portant l'ensemble des éléments et fonctions décrits précédemment est cloné dans le plasmide pBAC11 (pBeloBAC11) digéré par NotI. Les extrémités sont rendues compatibles par traitement avec l'enzyme de Klenow.

20 La carte du vecteur pOSV403 est représentée sur la Figure 21. Le schéma de la Figure 21 indique l'orientation retenue.

#### **Etape 6 :**

Le vecteur pOSV403 contient les sites HindIII et NsiI. Le site  
25 NsiI est assez rare chez *Streptomyces* et présente l'avantage d'être compatible avec PstI. En revanche, le site PstI est fréquent chez *Streptomyces* et peut être utilisé pour effectuer des digestions partielles.

Les clones recombinants portant un insert cloné dans le répresseur CI, et donc inactivant ce répresseur deviennent résistants à  
30 la tétracycline. Etant donné que les BACs ne sont présents qu'à raison d'une copie par cellule, il faut sélectionner les clones recombinants avec une dose plus faible de tétracycline que la dose habituelle de 20 µg/ml, par exemple avec une dose de 5 µg/ml. Dans ces conditions il n'y a aucun bruit de fond.

Il est aussi possible d'utiliser un système développé et commercialisé par la société InVitrogen, dans lequel l'insertion d'ADN dans le vecteur inactive un inhibiteur de la gyrase dont l'expression est toxique pour *E. coli*. Le fragment est préférentiellement isolé à partir du vecteur pZErO-2 (<http://www.invitrogen.com/>).

**Exemple 9 : Construction d'une banque de *S. alboniger* dans les 2 cosmides intégratif (pOS700I) et replicatif (pOS700R)**

**1) - Construction de la Banque**

Pour évaluer l'efficacité du système de clonage, la voie de biosynthèse de la puromycine de *Streptomyces alboniger*, a été clonée dans les deux cosmides navettes pOS700I et pOS700R. Les gènes de la voie de biosynthèse de la puromycine sont portés par un fragment d'ADN BamHI d'environ 15 Kb.

L'ADN génomique de *Streptomyces alboniger* a été isolé. 90% de cet ADN possède un poids moléculaire compris entre 20 et 150 Kb, déterminé par électrophorèse en champ pulsé.

Les deux cosmides ont été digérés par l'enzyme *Bam*HI (site unique de clonage).

Les conditions de digestion partielle *Bam*HI de l'ADN génomique ont été déterminées (50 µg d'ADN et 12 unités d'enzyme, 5 minutes de digestion). Après vérification de la taille par électrophorèse en gel d'agarose, l'ADN partiellement digéré a été introduit dans les vecteurs. Dans la ligation, 15 µg d'ADN génomique + 2 µg du vecteur intégratif ou 5 µg du vecteur réplcatif ont été utilisés.

Chaque mélange de ligation a été utilisé pour l'encapsidation in vitro de l'ADN dans les têtes de bactériophage lambda. Les mélanges d'encapsidation (0,5ml) ont été titrés (Vecteur intégratif pOS700I =  $7,5 \times 10^5$  cosmides/ml, Vecteur réplcatif =  $5 \times 10^4$  cosmides/ml).

Les cosmides ont été utilisés pour transférer *E. coli* et générer ainsi deux banques d'environ 25000 clones résistant à l'ampicilline. L'ADN de l'ensemble de ces clones a été isolé et quantifié.

Pour tester les banques, plusieurs clones ont été choisis, l'ADN purifié et a été digéré par BamHI, afin de vérifier la présence et la taille des inserts. Les clones testés contiennent entre 20 et 35 Kb d'insert de *S. alboniger*.

5

## **2) - Identification des clones contenant la voie de biosynthèse de la puromycine**

Les clones susceptibles de contenir la voie complète de biosynthèse de la puromycine ont été identifiés par hybridation avec une sonde correspondant au gène de résistance à la puromycine, le gène *pac* de 1,1 kb. (Lacalle et al. Gene 1989;79, 375-80 )

10

### **Banque faite dans le Vecteur Intégratif pOS 700I:**

15

Parmi 2000 clones analysés, 9 clones ont hybridé avec la sonde et ils contiennent des inserts d'environ 40 kb.

### **Banque faite dans le Vecteur replicatif pOS 700R:**

20

Parmi 2000 clones analysés, 12 clones ont hybridé avec la sonde; ils contiennent des inserts d'environ 40 kb.

25

En utilisant les données publiées par Tercero et al. (J Biol Chem. 1996; 271, 1579-90), les clones contenant la totalité de la voie de biosynthèse ont été identifiés, après hybridation avec des sondes appropriées. Certains cosmides intégratifs et replicatifs présentent après digestion ClaI-EcoRV un fragment de 12360 paires de bases, ce qui laisse supposer un insert contenant la totalité de la voie de biosynthèse de la puromycine.

30

## **4) - Vérification de la production de puromycine par les clones résistants (Rhône-Poulenc).**

### **a) Matériels et Méthodes**

#### **Souches et conditions de culture :**

5

Trois clones résistants ont été sélectionnés pour vérifier la production de puromycine. Ils correspondent aux recombinants de *S. lividans* contenant un insert dans le vecteur intégratif pOS700I (G 20) ou un insert dans le vecteur réplcatif (G21 et G22).

10

Des souches de référence ont été utilisées pour s'assurer que les milieux de culture utilisés permettaient cette production. Il s'agit de la souche sauvage *S. alboniger* ATCC 12461, productrice de puromycine et de la souche recombinante *S. lividans* contenant le cluster complet de la puromycine cloné dans le plasmide pRCP11 (Lacalle et al, 1992, the EMBO journal, 11, 785-792) (G23).

15

Les souches sontensemencés dans un milieu de culture dont la composition est la suivante :

20	Peptone bactériologique Organotechnie	5 g/l de milieu final
	Extrait de levure Springer	5
	Extrait de viande Liebig	5
	Glucose Prolabo	15
	CaCO3 (1) Prolabo	3
25	NaCl Prolabo	5
	Agar (2) Difco	1

(1) Les 3g de carbonate sont mélangés à 200ml d'eau distillée puis stérilisés à part. L'addition se faisant après stérilisation.

30

(2) L'agar est préalablement fondu dans 100ml d'eau distillée avant d'être ajouté aux autres ingrédients du milieu

pH ajusté à 7,2 avant stérilisation  
stérilisation 25 minutes à 121°C

35



50 µg/l d'hygromycine et 5 µg/l de thiostrepton sont ajoutés au milieu après stérilisation de façon à maintenir une pression de sélection des clones contenant un insert grâce au gène marqueur présent sur le vecteur ( le gène de résistance au thiostrepton étant porté par le plasmide pRCP11).

50 ml de milieu de culture liquide, répartis en erlenmeyers de 250 ml, sontensemencés avec 2 ml de suspension aqueuse de spores et de mycelium de chacune des souches. Les cultures sont incubées pendant 4 jours à 28°C avec une agitation de 220 trs/mn. 50 ml de milieux de production, répartis en erlenmeyers de 250 ml, sont ensuiteensemencés avec 2 ml de ces pré-cultures. Le milieu de production utilisé est un milieu industriel optimisé pour la production de pristinamycine (milieu RPR 201). Les cultures sont incubées à 28°C, avec une agitation de 220trs/mn. Après différents temps d'incubation, un erlenmeyer de chaque culture est amené à pH 11 puis extrait par 2 fois 1 volume de dichlorométhane. La phase organique est concentrée à sec sous pression réduite, puis l'extrait est repris par 10 µl de méthanol. 100 µl de la solution méthanolique sont analysés en CLHP munie d'un détecteur à barrette de diodes dans un système gradient eau-acétonitrile 0,05% TFA V/V sur colonne C18 pour la détection de la puromycine.

### **b) Résultats**

Les analyses HPLC comparatives à partir des cultures des différentes souches montrent la production de puromycine dans la culture de la souche sauvage à partir de 24 h d'incubation. Une production, bien que plus faible, est aussi nettement détectée à partir de 48 h dans la culture du clone G20 contenant le cosmide pOS700I (figure 23). La puromycine a également été détecté à l'état de trace dans le clone G23 contenant l'opéron complet codant pour le composé dans le plasmide pRCP11. Néanmoins, aucune production n'a été observée dans les cultures des clones G21 et G22 contenant le cosmide pOS700R. Les résultats sont reportés sur la Figure 23.

### **c) Conclusions**

Les résultats obtenus permettent de démontrer l'efficacité du système de clonage développé dans le cosmide pOS700I pour exprimer chez un hôte hétérologue tel que *S. lividans* une voie de biosynthèse complète sous le contrôle de séquences régulatrices qui lui sont propres. D'autre part, ces données valident également le criblage des banques obtenues sur la base de la résistance des clones à la puromycine puisqu'il a conduit à identifier parmi un petit nombre de clones, un recombinant capable d'exprimer la voie de biosynthèse associée au gène de résistance. L'absence de production de puromycine chez les autres clones peut probablement s'expliquer par le clonage d'une partie seulement de l'opéron contenant le gène de résistance mais dépourvue de certaines séquences de régulation, transduction ou transcription nécessaires à la synthèse du composé.

### **EXEMPLE 10 : - CLONAGE D'ADN DU SOL DANS DES VECTEURS**

#### **1) – Préparation de l'ADN du sol à cloner**

Les différents fragments d'ADN doivent être purifiés selon leur destination :

#### **Cosmides**

La taille des molécules doit être comprise entre 30 et 40kb. Or, l'ADN extrait du sol est hétérogène en taille et comprend des molécules atteignant 200 ou 300kb. Afin d'homogénéiser les tailles, l'ADN est cassé mécaniquement par passage de la solution à travers une aiguille de 0,4mm de diamètre. Les fragments d'une taille voisine de 30kb ne sont pas affectés par ces passages répétés à travers une aiguille et il n'est donc pas nécessaire de faire une séparation par la taille surtout que l'empaquetage dans les particules élimine automatiquement les inserts courts.

## **BACs**

### **Préparation de l'ADN**

5 L'ADN du sol est séparé par électrophorèse en champ pulsé (type CHEF) dans des conditions telles que les fragments compris entre 100 et 300kb sont concentrés dans une bande d'environ 5mm. Ceci est obtenu en réalisant la migration dans un gel à 0,7% d'agarose normal ou 1% d'agarose à bas point de fusion avec un temps de pulsation de 100 secondes pendant 20 heures et à une température de 10°C.

### **Récupération de l'ADN**

15 Deux méthodes sont utilisées, leur choix dépend de la taille des molécules que l'on veut isoler, soit jusqu'à 150kb soit au dessus.

#### **- Jusqu'à 150kb**

20 La porosité d'un gel à 0,7% d'agarose permet la sortie de l'ADN par électroélution à condition d'absence totale de bromure d'ethidium. Cet ADN est ensuite manipulé avec des instruments de pipetage à orifice agrandi et hydrophobe pour éviter la fragmentation mécanique des molécules.

#### **- Entre 100 et 300kb**

25 La bande contenant les fragments d'une taille entre 100 et 300kb est découpée. Pour la migration un gel d'agarose à 1% et à bas point de fusion est utilisé. Cette propriété permet de fondre le gel à une température supportable pour l'ADN de 65°C et de le digérer ensuite par l'agarase (Agarase commercialisée par la société Boehringer) à 30 une température de 45°C suivant les prescriptions du fournisseur.

## **2) - Utilisation des cosmides intégratifs pOS700I et replicatifs pOS700R**

### **5 Construction par queues polyA polyT**

#### **Principe**

Un vecteur cosmide, ouvert à un site de clonage quelconque, est modifié aux extrémités 3' en ajoutant un polynucléotide monotone. D'autre part, 10 l'ADN à cloner est modifié aux extrémités 3' en ajoutant un polynucléotide monotone pouvant s'apparier au précédent.

L'association vecteur-fragment à cloner se fait par ces polynucléotides et la séquence cos du vecteur permet l'empaquetage *in vitro* de l'ADN dans 15 des capsides de phage Lamda.

#### **Préparation du vecteur**

Le vecteur utilisé est un vecteur autorépliquatif chez *E. coli* et intégratif 20 chez *Streptomyces*.

Pour *E. coli*, la sélection se fait sur la résistance à l'ampicilline et pour *Streptomyces*, elle se fait sur la résistance à l'hygromycine .

Le cosmide est ouvert à l'un des 2 sites possibles (BamHI ou HindIII) et 25 les extrémités 3' sont rallongées par du polyA avec de la terminale transférase dans les conditions où le fournisseur de l'enzyme prévoit l'addition de 50 à 100 nucléotides.

#### **Préparation de l'ADN à insérer.**

30

Les extrémités 3' de l'ADN sont rallongées par du polyT avec de la terminale transférase dans les conditions fournissant un allongement comparable à celui du vecteur. Dans les conditions expérimentales décrites par le fabricant les queues polyA polyT sont longues de 30 à 70 35 bases

### **Assemblage des molécules et encapsidation in vitro.**

Pour l'assemblage des molécules, on mélange une molécule de vecteur  
5 pour une molécule d'ADN inséré. La concentration de l'ADN en masse  
est de 500  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ .

Le mélange est encapsidé et l'efficacité de transfection dépend de la  
souche utilisée comme réceptrice et de l'ADN inséré : nulle avec l'ADN  
test et la souche DH5 $\alpha$ , l'efficacité est comparable pour les souches  
10 SURE et DH10B ; à l'extraction le rendement en ADN est cependant  
plus élevé avec la souche DH10B.

### **Construction par déphosphorylation**

15 L'ADN du sol est mis en bouts francs par élimination des séquences 3'  
sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes. Cette opération est  
faite avec : enzyme de Klenow, T4 polymérase, les 4 nucléotides  
triphosphates. Le vecteur cosmétique est digéré par BamHI, puis traité  
par l'enzyme de Klenow pour le rendre bout franc puis déphosphorylé  
20 pour éviter qu'il ne se referme sur lui même. Après ligation, le mélange  
est encapsidé et transfecté comme précédemment décrit.

### **3) - Utilisation des pBAC**

#### **Principe.**

25

Le plasmide pBAC conjugatif et intégratif possède les sites HindIII et NsiI  
comme sites de clonage. L'insertion d'une séquence d'ADN à ces sites  
inactive le répresseur CI du phage Lambda qui contrôle l'expression du  
gène de la résistance à la tétracycline. L'inactivation du répresseur rend  
30 donc la cellule résistante à cet antibiotique ( $5\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ). Le clonage à ces  
sites est facilité par la modification du vecteur et la préparation de l'ADN  
à cloner.

### **Préparation du vecteur. Exemple HindIII**

5 Pour que le vecteur ne se referme pas sur lui-même, le site Hind III est modifié : la première base (A) est remise en place pour former une séquence 5' sortante, qui ne peut pas s'apparier avec ses semblables. L'opération est effectuée par l'enzyme de Klenow en présence de dATP.

10 Le succès de l'opération est vérifié en effectuant une ligation du vecteur sur lui-même avant et après traitement à l'enzyme de Klenow. A quantité d'ADN testé identique, on obtient 3000 clones avant traitement et 60 après traitement.

### **Préparation de l'ADN (taille comprise entre 100 et 300kb).**

#### **15 Mise en bouts francs de l'ADN.**

L'ADN est mis en bouts francs par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes. Cette opération est faite avec : enzyme de Klenow, T4 polymérase, les 4  
20 nucléotides triphosphates.

### **Préparation des extrémités.Exemple HindIII**

L'addition de l'ADN sur le vecteur se fait au moyen d'oligonucléotides reconnaissant la séquence HindIII modifiée du vecteur.  
25 Ils contiennent des sites de restriction rares pour permettre les clonages ultérieurs (SwaI ; NotI). cette technique est dérivée de celle de : Elledge SJ, Mulligan JT, Ramer SW, Spottswood M, Davis RW. Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Mar 1;88(5):1731-5

Deux oligonucléotides complémentaires sont utilisés :

30 Oligo 1 : 5'-GCTTATTTAAATATTAATGCGGCCGCCCGGG-3'  
(SEQ ID N°25)

Oligo 2 : 5'-CCCGGGCGGCCGCATTAATATTTAAATA-3' (SEQ ID N°26)

Ils sont phosphorylés en 5' par la polynucléotide kinase de T4 en présence d'ATP, après leur hybridation. Cette étape de phosphorylation peut être éliminée en utilisant les oligo-nucléotides déjà phosphorylés.

5 La ligation de cet adaptateur double brin avec l'ADN à insérer dans un vecteur est faite par la ligase de T4 en présence d'un très grand excès d'adaptateur (1000 molécules d'adaptateur pour une molécule d'ADN à insérer), en 15 heures à 14°C.

10 L'excès d'adaptateur est éliminé par électrophorèse sur un gel d'agarose et les molécules d'intérêt sont récupérées du gel par hydrolyse de celui-ci par de l'agarase ou par électroélution.

#### **Ligation vecteur- ADN .**

15 La ligation se fait à 14°C sur 15 heures avec 10 molécules de vecteur pour une molécule d'insert.

#### **Transformation.**

20 La souche réceptrice est la souche DH10B. La transformation se fait par électroporation. Pour exprimer la résistance à la tétracycline, les transformants sont incubés à 37 °C pendant 1 heure en milieu sans antibiotique. La sélection des clones se fait par culture pendant une nuit , sur milieu gélosé LB additionné de tétracycline à 5µg.ml<sup>-1</sup>.

### **Exemple 11 : CONJUGAISON CLONE A CLONE ENTRE *E. COLI* ET *STREPTOMYCES***

#### **CONJUGAISON ENTRE *E COLI* SOUCHE S17.1 CONTENANT PPM803 ET *STREPTOMYCES LIVIDANS* TK 21**

30

#### **Introduction**

Il est possible d'effectuer des conjugaisons entre *E. coli* et *Streptomyces* (Mazodier et al, 1989). L'adaptation de cette méthode en développant  
35 une technique dite en goutte où l'on mélange 10 µl d'une culture de *E.*

*coli* contenant un vecteur recombinant à une goutte de *S. lividans* récepteur consiste à réaliser une transformation de clone à clone en s'assurant qu'à la fin de l'opération toute la banque construite dans *E. coli* est introduite dans *S. lividans*. Une transformation en vrac amènerait  
5 obligatoirement à une multiplication des clones de *Streptomyces* transformants afin d'être pratiquement sûr que la banque dans *E. coli* est complètement représentée dans *S. lividans*.  
De plus cette méthode est facilement automatisable.

#### 10 Essais préliminaires

Conjugaison entre *E. coli* souche S17.1 contenant le vecteur pOSV303 et *S. lividans* TK21.

Dans ces conditions, on mélange  $6 \times 10^6$  cellules de *E. coli* avec  $2 \times 10^6$   
15 spores pré-germées de *S. lividans* dans un volume final de 20  $\mu$ l.

#### Mise au point de la méthode

Il est connu que l'ADN extrait de certains actinomycètes est modifié et de  
20 ce fait ne peut être introduit dans certaines souches de *E. coli* sans qu'il soit restreint. La souche de *E. coli* DH10B qui accepte ces ADN n'est pas capable de transférer à *Streptomyces* un plasmide ne contenant que *oriT*, et il est donc nécessaire d'en construire une. Il faudrait y introduire  
25 par intégration dans le chromosome un dérivé de RP4 capable de fournir en trans toutes les fonctions nécessaires pour assurer le transfert des clones recombinants contenant l'origine de transfert *oriT*.

#### Exemple 12 : Construction d'une banque cosmidique dans *E. coli* et *Streptomyces lividans* : Clonage de l'ADN du sol

30

L'objectif est la construction d'une librairie d'ADN de grande taille issue de l'environnement, sans étape préalable de culture des microorganismes, dans le but d'accéder aux gènes métaboliques de bactéries (ou de tout autre organisme) que l'on ne sait pas cultiver dans  
35 des conditions standard de laboratoire.



La procédure décrite a été utilisée pour générer une banque d'ADN dans *Escherichia coli* utilisant le cosmide navette *E. coli*-*S. lividans* pOS700I et de l'ADN extrait et purifié de la fraction bactérienne d'un sol . Cette dernière méthode permet d'obtenir de l'ADN d'une grande pureté et d'une taille moyenne de 40 kb. Aussi, afin d'éviter pour le clonage une digestion partielle de l'ADN extrait, a été adoptée une stratégie alternative basée sur l'utilisation de l'enzyme terminale transférase qui permet d'ajouter des queues de polynucléotides aux extrémités 3' de l'ADN et du vecteur.

5 µg d'ADN ont été extraits de 60 mg de sol de " la Côte Saint André " selon le protocole décrit à l'exemple 3 et traités avec de la terminale transférase (Pharmacia) pour rallonger les extrémités 3' avec un polynucléotide monotone (poly T) (Exemple 10).

Le cosmide intégratif pOS700I est préparé selon le protocole B1, Orsay. Après une étape classique de purification en présence de phénol/chloroforme, l'ADN et le vecteur sont assemblés en mélangeant une molécule de vecteur et une molécule d'ADN inséré. Le mélange est ensuite encapsidé dans les têtes de bactériophages lambda (kit Amersham) qui servent à transfecter *E. coli* DH10B. Les cellules transfectées sont ensuiteensemencées sur milieu LB agar en présence d'ampicilline pour sélection des recombinants résistants à cet antibiotique.

Une banque d'environ 5000 clones d'*E. coli* résistants à l'ampicilline a été obtenue. Chaque clone a été ensemencé en milieu LB ou TB + ampicilline dans un puits de microplaque (96 puits) et conservé à -80°C .

La séquence aux sites d'insertions des fragments du sol dans le vecteur, pOS700I, générés pendant la construction de la banque a été analysée. Pour cela 17 cosmides de la banques ont été purifié et séquencé avec une amorce, seq.5' CCGCGAATTCTCATGTTTGACCG 3', qui hybride entre les site BamHI et le site de clonage HindIII présente dans le vecteur.

Les séquences obtenues ont permis d'estimer que la longueur des queues homopolymériques aux points de jonctions est très variable, entre 13 et 60 poly-dA/dT. Au-delà des queues, les séquences des fragments du sol ainsi générées possèdent un pourcentage en G+C  
5 entre 53 et 70 %. Des pourcentages si élevés étaient inattendus, mais des résultats similaires ont été déjà reportés sur des préparation brut d'ADN à partir de sol (Chatzinotas A. *et al.*, 1998).

10 Une stratégie de "pooling" de 48 ou 96 clones à été utilisée pour l'analyse de la richesse microbienne et métabolique. L'ADN cosmidique extrait à partir de ces "pools" de clones à été utilisé ensuite pour réaliser des expériences de PCR ou d'hybridation.

15

**Exemple 13 : Diversité de l'ADN ribosomique 16S au sein de l'ADN cloné.**

**a) Matériels et méthodes**

20 Les cosmides de la banque sont extraits à partir de pools de clones par lyse alcaline puis sont purifiés sur gradient de chlorure de césium, afin de prélever la bande d'ADN cosmidique sous forme super-enroulée et dans le but d'éliminer tout ADN chromosomique d'*Escherichia coli* pouvant interférer dans l'étude.

25 Après linéarisation des cosmides par action de la nucléase S1 (50 unités, 30 minutes à 37°C), les séquences d'ADNr 16S contenues dans les pools de clones sont amplifiées dans les conditions standard d'amplification, à partir des amorces universelles 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') et 1387r (5'-  
30 GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') définies par MARCHESI *et al.*(1998). Les produits d'amplification d'environ 1.5 kilobases sont purifiés à partir du kit Qiaquick gel extraction (Qiagen) puis directement clonés dans le vecteur pCR II (Invitrogen) chez *Escherichia coli* TOP10, selon les instructions du fabricant. L'insert est alors amplifié à l'aide des amorces  
35 M13 Forward et M13 reverse spécifiques au site de clonage du vecteur

pCR II. Les produits d'amplification de taille attendue (environ 1,7 kb) sont analysés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) à l'aide des enzymes CfoI, MspI et BstUI (0,1 unités) afin de sélectionner les clones à séquencer. Les profils de restriction obtenus sont séparés  
5 sur gel d'agarose Metaphore 2.5% (FMC Products) contenant 0,4 mg de bromure d'éthidium par ml.

Les séquences d'ADNr 16S sont alors déterminées directement en utilisant les produits PCR purifiés par le kit " Qiaquick gel extraction " à l'aide des amorces de séquençage définies par Normand (1995). Les  
10 analyses phylogénétiques sont obtenues en comparant les séquences avec les séquences d'ADNr 16S procaryotes rassemblées dans la base de données Ribosomal Database Project (RDP), version 7,0 MAIDAK et al.(1999) grâce au programme SIMILARITY MATCH, permettant d'obtenir les valeurs de similarité par rapport aux séquences de la base  
15 de données.

#### **b) Résultats**

Pour déterminer la diversité phylogénétique représentée dans la banque, 47 séquences du gène ARNr16S ont été isolées à partir de  
20 pools de 288 clones et ont été séquencées dans leur quasi-totalité. Les résultats sont rapportés dans le tableau 7.

L'analyse des séquences par interrogations des bases de données révèle que la majorité des séquences (>61%) présentent des  
25 pourcentages de similarité inférieurs ou égaux à 95% avec des espèces bactériennes identifiées (tableau 7). Sur les 47 séquences analysées, 28 séquences ont pour plus proches voisins des bactéries non cultivées, dont les séquences ont été directement issues d'ADN extrait de l'environnement. La majorité de ces séquences présentent par ailleurs  
30 des pourcentages de similarité très faibles (88-95%), 17 séquences sur 28 diffèrent ainsi de plus de 5% par rapport à leurs voisins les plus proches.

Parmi les séquences pouvant être classées dans un groupe phylétique, une majorité de séquences appartiennent à la sous classe a  
35 des protéobactéries (18 séquences avec un pourcentage de similarité

compris entre 89 et 99%). Un second groupe de séquences est représenté par la sous classe g des protéobactéries, comprenant 9 séquences dont les pourcentages de similarité varient entre 84 et 99%). Les groupes des b-protéobactéries, d-protéobactéries, firmicutes à bas G+C% et à haut G+C% comprennent respectivement 1, 4, 3 et 5 séquences. Seule une séquence n'a pu être classée au sein des grands groupes taxonomiques bactériens définis : la séquence a22.1(19), son plus proche voisin *Aerothermobacter marianus* (avec une similarité de 89%) étant lui même une souche isolée de l'environnement marin et non classifiée à l'heure actuelle. Enfin, 6 séquences peuvent être classées au sein du groupe des *Acidobacterium/ Holophaga*. Ce groupe présente la particularité de n'être représenté que par deux bactéries cultivées *Acidobacterium capsulatum* et *Holophaga foetida*, l'ensemble de ce groupe étant composé par des bactéries dont seul le gène ARNr16S a été détecté par amplification et clonage à partir d'ADN extrait d'échantillon de l'environnement (principalement de sol), Ludwig *et al* (1997). Les faibles valeurs de similarité entre les différentes séquences composant ce groupe laisse présager une grande hétérogénéité et diversité au sein de ce groupe.

L'ensemble des résultats est représenté sur le tableau 7.

Ces résultats montrent que les séquences contenues dans la banque cosmidique proviendraient de micro-organismes non seulement diversifiés phylogénétiquement mais surtout de micro-organismes n'ayant jamais été isolés jusqu'à ce jour.

Les résultats du séquençage des ADN amplifiés ont permis d'établir un arbre phylogénétique des organismes présents dans l'échantillon de sol dont les séquences caractérisées sont originaires.

L'arbre phylogénétique représenté à la figure 7 a été réalisé à partir de l'alignement des séquences par le logiciel MASE (Faulner et Jurak, 1988) et corrigé par la méthode des 2 paramètres de Kimura (1980), et à l'aide de l'algorithme Neighbour Joining (Saitou et Nei 1987). L'analyse phylogénétique a permis de comparer les séquences ADNr 16S clonées dans la banque d'ADN du sol, avec les séquences d'ADNr 16S procaryotes rassemblées dans les bases de données Ribosomal

Database Project (RDP), (version 7.0, programme SIMILARITY-MATCH, Maidak *et al* 1999), et dans la base GenBank grâce au logiciel BLAST 2.0 (Atschul *et al*, 1997).

5

#### **Exemple 14 : Présélection génétique de la banque pour l'évaluation de la richesse métabolique**

10 Pour caractériser la banque obtenue en terme de diversité métabolique et identifier les clones contenant des inserts portant des gènes pouvant être impliqués dans des voies de biosynthèse, il a été développé selon l'invention des techniques de criblage génétique basées sur des méthodes PCR afin de détecter et d'identifier des gènes PKS de type I.

15

#### **1 Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture**

20 *S. coelicolor* ATCC101478, *S. ambofaciens* NRRL2420, *S. lactamandurans* ATCC27382, *S. rimosus* ATCC109610, *B. Subtilis* ATCC6633 et *B. licheniformis* THE1856 (collection RPR) ont été utilisés comme sources d'ADN pour les expériences de PCR. *S. lividans* TK24 est la souche hôte utilisée pour le cosmide navette POSI700.

25 Pour la préparation d'ADN génomique, de suspensions de spores, de protoplastes et pour la transformation de *S. lividans*, on a suivi les protocoles standard décrits dans Hopwood *et al.*(1986).

30 *Escherichia coli* Top10 (INVITROGEN) a été utilisé comme hôte pour le clonage des produits PCR et *E. coli* Sure (STRATAGENE) a été utilisé comme hôte pour le cosmide navette pOS700I. Les conditions de culture de *E. coli*, la préparation de plasmides, la digestion de l'ADN, l'électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées suivant les procédures standard (Sambroock *et al.*,1996).

#### **2. Amorces PCR:**

35 Les couples d'amorces a1-a2 et b1-b2 ont été définis par l'équipe de N. Bamas-Jacques et leur utilisation a été optimisée pour le

criblage de l'ADN des souches pures et de la banque du sol pour la recherche de gènes codant PKS I)

**Tableau 8 :**

5 **Amorces PCR homologues aux gènes PKS I utilisées pour le criblage de la banque.**

a1 (+)	5' CCSCAGSAGCGCSTTTTCTSGA 3'
a2 (-)	5' GTSCCSGTSCCGTGSGTSTCSA 3'
b1	5' CCSCAGSAGCGCSTTCTCTSGA 3'
b2	5' GTSCCSGTSCCGTGSGCCTCSA 3'

10 **Conditions d'amplification :**

Pour la recherche de PKS I à partir de l'ADN de souches pures, le mélange d'amplification contenait : dans un volume final de 50 µl, entre 50 et 150 ng d'ADN génomique, 200 µM de dNTP, 5mM de MgCl<sub>2</sub> final, 7% de DMSO, tampon 1x Appligene, 0,4 µM de chaque primer et 2,5U de Taq Polymerase Appligène. Les conditions d'amplification utilisées sont : dénaturation à 95°C pendant 2 minutes, hybridation à 65°C pendant 1 minute, élongation à 72°C pendant 1 minute, pour le premier cycle, suivi par 30 cycles où la température est diminuée jusqu'à 58°C comme décrit dans K. Seow *et al.*, 1997. L'étape d'extension finale s'effectue à 72°C pendant 10 minutes.

Pour la recherche de PKS I à partir de l'ADN de la banque, les conditions PCR sont les mêmes que ci-dessus pour le couple a1-a2 en utilisant entre 100 et 500 ng de cosmide extrait de pools de 48 clones. Pour le couple d'amorces b1-b2, 500ng de cosmides issus de pools de 96 clones ont été utilisés. Le mélange d'amplification contenait 200 µM

de dNTP, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> final, 7% de DMSO, tampon 1x Quiagen, 0,4 µM de chaque primer et 2,5U de Taq polymerase Hot-start (Quiagen). Les conditions d'amplification utilisées sont : dénaturation 15' à 95°C suivie par 30 cycles : 1' de dénaturation à 95°C + 1' d'hybridation à 65°C pour le premier cycle et 62°C pour les autres cycles, 1' d'élongation à 72°C, étape d'extension finale de 10' à 72°C.

L'identification des clones positifs à partir des pools de 48 ou 96 clones est effectuée à partir des répliques des microplaques mères correspondantes sur milieu solide ou toute autre méthode standard de réplication.

### **3 Sous-clonage et séquençage**

Les produits PCR des clones identifiés ont été séquencés selon le protocole suivant :

Les fragments sont purifiés sur gel d'agarose (Gel Extraction Kit (Quiagen)) et clonés dans *E.coli* TOP 10 (Invitrogen) à l'aide du kit TOPO TA cloning kit (Invitrogen). L'ADN plasmidique de sous-clones est extrait par lyse alcaline sur un Biorobot (Quiagen) et dialysé durant 2 h sur membrane VS 0,025µm (Millipore). Les échantillons sont séquencés avec les amorces M13 " Universal " et " Reverse " sur le séquenceur ABI 377 96( PERKIN ELMER).

### **4) Résultats**

#### **Définition et validation des amorces PCR**

Deux régions très conservées de PKS du type I d'actinomycètes, comprenant le site actif de l'enzyme, ont été ciblées pour l'amplification de gènes homologues avec des amorces dégénérées. Ces deux régions correspondent aux séquences PQQR(L)(L)LE et VE(A)HGTGT respectivement.

Des amorces (tableau 8) ont été testées avec l'ADN de souches productrices ou non de macrolides: *Streptomyces coelicolor*,

*Streptomyces ambofaciens*, producteur de spiramycine, et *Saccharopolyspora erythraea*, producteur de l'erythromycine. Quelles que soient les amorces utilisées, des bandes représentant des fragments d'environ 700 pb et correspondant à la longueur du fragment attendu, ont été obtenues avec toutes les souches.

Ces résultats démontrent la spécificité des amorces a et b pour les gènes PKS I de souches productrices ou de gènes silencieux chez *S. coelicolor*.

Le séquençage des produits PCR obtenus avec le couple d'amorces a1-a2 a permis d'identifier, à partir de la souche *S. ambofaciens*, la séquence d'un gène KS déjà décrite (Demande de brevet européen n° EP0791656) comme appartenant à la voie de biosynthèse du planténolide, précurseur macrolidique de la spiramycine, et deux séquences jamais décrites, Stramb 9 et Stramb12, (voir liste séquences).

En ce qui concerne, *S. erythraea*, la méthode de criblage a permis l'identification d'une séquence de KS (sacery17) identique à celle du KS du module 1 déjà publiée dans Genebank (Numéro d'accès M63677), codant pour la synthétase 1 (DEBS1) du 6-deoxyérythronolide B. Une autre séquence non corrélée à la voie de biosynthèse de l'érythromycine a été identifiée et il s'agit de la séquence SEQ ID N° 32.

## **Conclusion**

Une méthode pour analyser la présence de gènes codant pour les PKS du type I par PCR à partir de différents micro-organismes a été mise au point. La structure très conservée du domaine de la keto-synthétase du type I a permis de réaliser une méthode PCR basée sur l'utilisation d'amorces dégénérées biaisées en GC pour le choix des codons.

Cette approche montre la possibilité d'identifier des gènes ou clusters impliqués dans la voie de biosynthèse des polyketides du type I. Le clonage de ces gènes permet la création d'une collection qui pourra



ensuite être utilisés pour construire des hybrides polyketides. Le même principe peut être appliqué à d'autres classes d'antibiotiques.

Les résultats obtenus ici montrent aussi la présence de gènes pouvant appartenir à des clusters silencieux (SEQ ID N° 30 à 32).

5        La présence de clusters silencieux a été déjà documentée dans *S. lividans* et leurs expressions sont déclenchées par des régulateurs spécifiques ou pleiotropiques (Horinouchi et al. ; Umeyama et al. 1996) . Ces résultats suggèrent que la détection de gènes appartenant à des voies dites silencieuses codent en réalité pour des enzymes actives  
10 capable de diriger, en association avec les autres enzymes spécifiques de la voie, les étapes enzymatiques nécessaires pour la synthèse des métabolites secondaires.

### Criblage de la banque

15        Le criblage a été effectué dans les conditions décrites dans la section Matériels et Méthodes en utilisant les couples d'amorces validées à partir de souches productrices.

20        En présence du couple d'amorces a1-a2 , la taille des produits PCR obtenus à partir de l'ADN cosmidique extrait de pools de 48 ou 96 clones était d'environ 700 bp, donc en accord avec les résultats attendus.

      L'intensité des bandes obtenues était variable, mais une seule bande d'amplification était présente pour chaque pool d'ADN cible.

25        Dans ces conditions, 8 groupes d'ADN cible ont été détectés, correspondant à 9 clones positifs après déréplication.

      Le criblage effectué avec le second couple d'amorces, b1-b2, a donné des résultats d'amplification moins spécifiques puisque de nombreuses bandes satellites étaient observées à côté de la bande de 700 bp.  
30 Néanmoins, 9 groupes d'ADN cible ont été détectés, correspondant à 14 clones positifs après déréplication à partir de ces clones positifs, l'ADN a été extrait pour les étapes de séquençage et de transformation de *S. lividans*.

### **Analyse des cosmides**

La digestion des cosmides identifiés par PCR avec l'enzyme Dral, reconnaissant un site riche en AT, libère un fragment supérieur à 23 kb (figure 22). Ceci suggère que la méthode PCR cible préférentiellement l'ADN du sol contenant un haut pourcentage en G+C. Ce résultat est la conséquence de la dégénérescence des amorces utilisées, biaisées en GC pour le choix des codons. Les inserts, comme attendu dans le cas de cosmides, ont une taille supérieure à 23 kb, sauf dans un cas ( clone a9B12), ce qui pourrait traduire une certaine instabilité des cosmides. D'autre part, parmi tous les clones sélectionnés, seulement deux d'entre eux, GS.F1 et GS.G11, ont montré le même profil de restriction indiquant un faible taux de redondance dans la banque.

Les cosmides sélectionnés ont été transférés dans *Streptomyces lividans* par transformation de protoplastes en présence de PEG 1000. L'efficacité de transformation varie entre 30 et 1000 transformants par µg d'ADN cosmétique utilisé.

### **Séquençage et analyse phylogénétique des gènes PKS I du sol**

La méthode de PCR mise à point sur les souches pures a été utilisée comme décrite sur les cosmides de la banque et 24 clones ont ainsi été identifiés.

Les produits de PCR d'environ 700 bp obtenus à partir de l'ADN de deux pools (48 clones) et de 8 clones uniques, ont été clonés, après purification sur gel d'agarose , et séquencés. Cela a permis l'identification de 11 séquences.

L'alignement des séquences protéiques déduites PKSs I du sol avec d'autres PKSs I présentes dans différents micro-organismes (figure 24) montre la présence d'une région très conservée qui correspond à la région consensus du site active de la b-kétoacyl synthétase.

L'analyse des séquences obtenues avec la méthode "Codonpreference" (Gribskov *et al.*, 1984 ; Bibb *et al.*, 1984) a révélé la présence d'un fort biais dans l'usage des codons riches en G+C dans une seule phase de lecture. Les protéines déduites selon cette phase  
5 de lecture montrent une forte similarité avec des KSs du type I connus (programme Blast). En particulier, la similarité entre les séquences de KSs du sol et des KSs du cluster de l'érythromycine est d'environ 53%.

Après déréplication d'un pool et identification du clone unique, la séquence du produit PCR obtenu à partir de ce clone est identique à  
10 celle du pool ce qui confirme la fiabilité de la méthode utilisée.

L'analyse de la séquence du produit PCR d'un clone a permis l'identification probable de 3 gènes KSI différents. Une de ces séquences (SEQ ID N° 34) a une similarité de 98,7% avec la séquence d'un autre pool, suggérant qu'elles codent pour la même enzyme. Les  
15 deux autres séquences sont différentes mais fortement homologues.

Ici, il est décrit pour la première fois le clonage et l'identification dans une banque d'ADN du sol de voies de biosynthèse de métabolites secondaires contenant des gènes codant des KS du type I.

Le pourcentage élevé en G+C des séquences du sol suggère  
20 qu'elles puissent dériver de génomes ayant un usage des codons similaire à ceux d'actinomycètes.

Même si les données disponibles dans la littérature sont réduites, on sait que les gènes codant des PKS du type I sont très diversifiés de par leur organisation physique dans le génome, la taille et le nombre de  
25 modules contenus dans chaque gène.

La présence de plusieurs domaines provenant d'un seul clone est une confirmation de leur appartenance à des clusters de polyketides asymétriques. Dans un seul cas, deux clones semblent former un contigue puisqu'ils partagent la même séquence pour le domaine KS.

30 La taille des régions génétiques impliquées dans la synthèse des PKS I varie entre quelques kb pour la pénicilline à environ 120 kb pour la rapamycine. La dimension des inserts cosmidiques peut donc ne pas être suffisante pour l'expression des clusters les plus complexes.

Des gènes codant pour des PKSs I, capables de travailler de  
35 façon itérative comme les PKS II et de contrôler la synthèse de

polykétides aromatiques, ont été décrits (Jae-Hyuk et al., 1995). L'étude des clusters des PKSs I du sol pourrait apporter encore des nouveautés dans ce domaine.

5            **5. Identification de 6 gènes codant des polykétides synthases .**

On poursuivant le criblage de la banque de cosmides selon les protocoles décrits dans le présent exemple, les inventeurs ont identifiés  
10 un clone de cosmide contenant un insert de 34071 pb contenant plusieurs cadres ouverts de lecture codant pour des polypeptides du type polykétide synthase.

Plus précisément, le cosmide ainsi identifié par criblage de la banque contient six cadres ouverts de lecture codant pour des  
15 polypeptides polykétide synthase ou pour des polypeptides fortement apparentés, des peptides synthase non ribosomiques. Une carte détaillée de ce cosmide est représentée à la figure 36.

La séquence nucléotidique complète du cosmide constitue la séquence SEQ ID N°113 du listage de séquences. L'insert d'ADN  
20 contenu dans la séquence SEQ ID N°113 constitue la séquence nucléotidique complémentaire (brin - ) de la séquence nucléotidique codant pour les différents polykétides synthases.

La séquence nucléotidique de l'insert d'ADN contenue dans le cosmide de la figure 36 qui comprend les cadres de lecture ouverts  
25 codant pour les polypeptides polykétides synthases (brin +) est schématisée sur la figure 37 et constitue la séquence SEQ ID N°114 du listage de séquences.

De plus, une carte détaillée des différents cadres de lecture ouverts contenus dans l'insert d'ADN de ce cosmide est représentée à la  
30 figure 37.

Les caractéristiques des séquences nucléotidiques comprenant des cadres ouverts de lecture contenus dans l'insert d'ADN de ce cosmide sont détaillées ci-après.

### Séquence ORF1

La séquence orf1 comprend un cadre ouvert de lecture partielle d'une longueur de 4615 nucléotides. Cette séquence constitue la  
5 séquence SEQ ID N°115, qui débute au nucléotide en position 1 et se termine au nucléotide en position 4615 de la séquence SEQ ID N°114.

La séquence SEQ ID N°115 code pour le polypeptide ORF1 de 1537 acides aminés, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID  
N°121.

10 Le polypeptide de séquence SEQ ID N°121 est apparenté aux peptides synthases non ribosomiques. Ce polypeptide possède un degré d'identité en acides aminés de 37% avec le peptide synthase de *Anabaena* sp.90 référencé sous le numéro d'accès « emb CACO1604.1 » dans la base de données Genbank.

### Séquence ORF2

La séquence nucléotidique orf2 a une longueur de 8301 nucléotides et constitue la séquence SEQ ID N°116, qui débute au  
20 nucléotide en position 4633 et se termine au nucléotide en position 12933 de la séquence SEQ ID N°114.

La séquence ORF2 code pour le peptide ORF2 d'une longueur de 2766 acides aminés, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID  
N°122.

25 Le polypeptide de séquence SEQ ID N°122 possède une identité de séquence en acides aminés de 41% avec la séquence MtaD de *Stigmatella aurantiaca* référencée sous le numéro d'accès « gb AAF 19812.1 » de la base de données GENBANK.

Le polypeptide ORF2 constitue une polykétide synthase.

### Séquence ORF3

La séquence nucléotidique orf3 a une longueur de 5292 nucléotides et constitue la séquence SEQ ID N°117. La séquence SEQ  
35 ID N°117 correspond à la séquence qui débute au nucléotide en position

12936 et qui se termine au nucléotide en position 18227 de la séquence SEQ ID N°114.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°117 code pour le polypeptide polykétide synthase ORF3 de 1763 acides aminés, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID N°123 selon l'invention.

Le polypeptide ORF3 de séquence SEQ ID N°123 possède une identité de 42% en acides aminés avec la séquence MtaB de *Stigmatella aurantiaca* référencée sous le n° d'accès « gb AAF 19810.1 » de la base de données GENBANK.

#### Séquence ORF4

La séquence nucléotidique orf4 a une longueur de 6462 nucléotides et constitue la séquence SEQ ID N°118 selon l'invention.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°118 correspond à la séquence débutant au nucléotide en position 18224 et se terminant au nucléotide en position 24685 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°114.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°118 code pour le polypeptide polykétide synthase ORF4 de 2153 acides aminés, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID N°124 selon l'invention.

Le polypeptide ORF4 de séquence SEQ ID N°124 possède une identité de séquence en acides aminés de 46% avec la séquence epoD de *Sorangium cellulosum* référencée sous le n° d'accès « gb AAF62883.1 de la base de données GENBANK.

#### Séquence ORF5

La séquence nucléotidique orf5 a une longueur de 5088 nucléotides et constitue la séquence SEQ ID N°119 selon l'invention.

La séquence SEQ ID N°119 correspond à la séquence débutant au nucléotide en position 24682 et se terminant au nucléotide en position 29769 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°114.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°119 code pour le polypeptide polykétide synthase ORF5 de 1695 acides aminés, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID N°125 selon l'invention.

5 Le polypeptide polykétide synthase ORF5 de séquence SEQ ID N°125 possède une identité en acides aminés de 43% avec la séquence epod de *Sorangium cellulosum* référencé sous le n° d'accès « gb AAF 62883.1 » de la base de données GENBANK.

### Séquence ORF6

10

La séquence nucléotidique orf6 a une longueur de 4306 nucléotides, et constitue la séquence SEQ ID N°120 selon l'invention. La séquence nucléotidique SEQ ID N°120 correspond à la séquence débutant au nucléotide en position 29766 et se terminant au nucléotide en position 34071 de la séquence SEQ ID N°114.

15

La séquence SEQ ID N°120 contient un cadre ouvert de lecture partielle codant pour le polypeptide ORF6 de 1434 acides aminés du type polykétide synthase, ce polypeptide constituant la séquence SEQ ID N°126 selon l'invention.

20

Le polypeptide de séquence SEQ ID N°126 possède une identité en acides aminés de 43% avec la séquence epod de *Sorangium cellulosum* référencée sous le numéro d'accès « gb AAF 62883.1 » de la base de données GENBANK.

25

### EXEMPLE 15: Construction de vecteurs navettes de type BAC intégratifs chez *Streptomyces*

#### Construction de vecteurs navettes du type BAC intégratifs et conjugatifs chez *Streptomyces*

30

#### 15.1 Construction du vecteur pMBD-1

Le vecteur BAC pMBD-1 a été obtenu selon les étapes suivantes:

**Etape 1:** Le vecteur pOSVO10 a été soumis à une digestion par les enzymes PsTI et BstZ17I afin d'obtenir un fragment nucléotidique de 6,3 kb.

5       **Etape 2:** Le vecteur pDNR-1 a été digéré par les enzymes PstI et PvuII afin d'obtenir un fragment nucléotidique de 4,145 kb.

10       **Etape 3:** Le fragment nucléotidique de 6,3 kb provenant du vecteur pOSV017 a été fusionné par ligation au fragment de 4,15 kb provenant du vecteur pDNR-1, afin de produire le vecteur pMBD-1, comme cela est illustré à la figure 30.

### **15.2 Construction du vecteur pMBD-2**

15       Le vecteur pMBD-2 est un vecteur du type BAC contenant une boîte intégrative «  $\phi$ c31 int- $\Omega$ hyg ».

20        $\phi$ c31 est un phage tempéré à spectre d'hôte large dont le site d'attachement (attP) est bien localisé. Le fragment  $\phi$ c31 int est le fragment minimal de l'actinophage  $\phi$ c31 capable d'induire l'intégration d'un plasmide dans le chromosome de *Streptomyces Lividans*.

$\Omega$ hyg est un dérivé de l'interposon  $\Omega$  capable de conférer la résistance à l'hygromicine chez *E.coli* et *S.Lividans*.

25       Des vecteurs BAC contenant le système d'intégration  $\phi$ c31 sont décrits par SOSIO et al. (2000) et dans la demande PCT n°99 6734 publiée le 29 Décembre 1999.

      Le vecteur BAC pmBD-2 a été construit selon les étapes suivantes:

**Etape 1:** Construction d'une boîte intégrative  $\phi$ c31int  $\Omega$ hyg dans un plasmide multicopies de *E.coli*.

30       On a tout d'abord amplifié le fragment  $\phi$ c31int à partir du plasmide pOJ436 à l'aide du couple d'amorces suivant:

      - L'amorce EV $\phi$ c31I (SEQ ID N°109) (qui permet d'introduire un site EcoRV à l'extrémité 5' de la séquence  $\phi$ c31) et l'amorce BII $\phi$ c31F (SEQ ID N°110) (qui permet l'introduction d'un site BglII à l'extrémité 3' de la séquence  $\phi$ c31).

35



Le fragment  $\Omega$ hyg a été obtenu par digestion à l'aide de l'enzyme BamHI du plasmide pHP45  $\Omega$ hyg décrit par BLONDELET-ROUAULT (1997).

5 Puis la boîte intégrative  $\phi$ c31 int- $\Omega$ hyg a été clonée dans le vecteur pMCS5 digéré par les enzymes BglII et EcoRV.

### **Etape 2: Construction du vecteur pMBD-2.**

10 Le chromosome artificiel bactérien pBAce3.6 décrit par FRENGEN et al. (1999) a été digéré par l'enzyme NheI puis traité par l'enzyme Eco polymérase.

Puis, le vecteur pMCS5  $\phi$ c31 int- $\Omega$ hyg a été digéré par les enzymes SnaBI et EcoRV afin de récupérer la boîte intégrative.

15 La carte détaillée du vecteur pMBD2 est représentée à la figure 31.

### **15.3 Construction du vecteur pMBD-3.**

20 Le vecteur pMBD-3 est un vecteur intégratif ( $\phi$ c31 int) et conjugatif (OriT) du type BAC, qui comprend le marqueur de sélection  $\Omega$ hyg.

La carte du vecteur pMBD-3 ainsi que son procédé de construction sont illustrés à la figure 31.

25 Le vecteur pMBD-3 a été obtenu en amplifiant le gène OriT à partir du plasmide pOJ436 à l'aide du couple d'amorces de séquences SEQ ID N° 111 et SEQ ID N°112 qui contiennent des sites de restriction pacl.

30 Le fragment nucléotidique amplifié à l'aide des amorces SEQ ID N°111 et SEQ ID N°112 a été cloné dans le vecteur pMBD2 préalablement digéré par l'enzyme Pacl. Le schéma de construction du vecteur pMBD-3 est illustré à la figure 31.

#### **15.4 Construction du vecteur pMBD-4**

La carte détaillée du vecteur pMBD-4 est représentée à la figure 32.

- 5        Le vecteur pMBD4 a été obtenu en clonant la boîte intégrative  $\phi$ c31 int- $\Omega$ hyg dans le vecteur pCYTAC2.

#### **15.5 Construction du vecteur pMBD-5**

- 10        Le schéma de construction du vecteur pMBD-5 est illustré à la figure 33.

- Le vecteur pMBD-5 a été construit par recombinaison du fragment nucléotidique compris entre les deux sites loxP du vecteur pMBD-1 illustré à la figure 33 avec le site loxP contenu dans le vecteur BAC désigné pBTP3, une carte détaillée du plasmide pBTP3 étant  
15 représentée à la figure 34.

#### **15.6 Construction du vecteur pMBD-6**

- 20        Le vecteur pMBD-6 a été construit en recombinant le fragment nucléotidique compris entre les deux sites loxP du vecteur pMBD-1 au niveau du site loxP du vecteur BAC pBeloBac11, comme représenté sur la figure 35.

25

**TABEAU 1**  
**Localisation des prélèvements d'échantillon et caractéristiques des sols utilisés**  
**dans les différentes expériences. Les comptes microbiens directs en utilisant**  
**la coloration à l'acridine orange ont été réalisés avant et après broyage du sol**

Numéro	Origine	Texture	Quantité (%) de sable Limon Argile	Matière organique (g/kg de sol sec)	pH	Nombre de cellules avant broyage <sup>a</sup> (x10 <sup>9</sup> /g poids sol sec	Nombre de cellules après broyage <sup>a</sup> (x10 <sup>9</sup> /g poids sol sec
1	Australie	Argile sablonneuse	62 22 16	49,7	5,8	6,5(0,9)	2,9(1,3)
2	Peyrat le Château, France	Argile sablonneuse	61 26 13	48,2	4,9	7,3(0,6)	5,4(0,8)
3	Côte St-André, France	Terreau sablonneux	50 41 9	40,6	5,6	10,0(0,7)	7,5(1,4)
4	Chazay d'Azergue, France	Terreau sablonneux argileux	34 47 19	13,9	5,8	7,8(1,1)	4,2(0,6)
5	Guadeloupe, France	Argile	27 26 47	17,0	4,8	1,4(0,4)	0,5(0,1)
6	Dombes, France	Terreau sablonneux Argileux	20 67 13	30,3	4,3	7,5(0,5)	5,6(0,9)

<sup>a</sup> n=3; déviation standard entre parenthèses.

**TABEAU 2**  
**Amorces et sondes utilisées pour l'amplification PCR et**  
**l'hybridation sur tâche**

Amorce ou sonde	Cible <sup>a)</sup>	Séquence (5' à 3')	Référence n°
FGPS431 sonde	Universelle (1392-1406)	ACGGCGGTGTGT(A/G)C	Amann et al., 1995
FGPS122 amorce	Bactéries (6-27)	GGAGAGTTTGATCATGGCTCAG	Amann et al., 1995
FGPS350 amorce	<i>Streptosporangium</i> (616-635)	CCTGGAGTTAAGCCCCCAAGC	Cette étude
FGPS643 sonde	<i>Streptosporangium</i> (122-142)	GTGAGTAACCTGCCCC(T/C)GACT	Cette étude
R499 amorce	<i>Bacillus anthracis</i>	TTAATTCACCTTGCAACTGATGGG	Patra et al., 1996
R500 amorce	<i>Bacillus anthracis</i>	AACGATAGCTCCTACATTTGGAG	Patra et al., 1996
C501 sonde	<i>Bacillus anthracis</i>	TTGCTGATACGGGTATAGAACCTGGC	Patra et al., 1996
FGPS16 amorce	<i>S. lividans</i> OS48.3	TCCAGATCCTTGACCCCGCAG	Cette étude
FGPS17 amorce	<i>S. lividans</i> OS48.3	CACGACATTGCACCTCCACCG	Cette étude
FGPS18 sonde	<i>S. lividans</i> OS48.3	CCGTGAGCCGGGATCAG	Cette étude

<sup>a)</sup> Les positions sur le gène de l'ARNr 16S de *E. coli* sont données entre parenthèses. Pour *B. anthracis* et *S. lividans*, les amorces et les sondes ciblent des séquences chromosomiques spécifiques des organismes respectifs. Ces séquences ne sont pas localisées dans le gène de l'ARNr 16S. La cassette contenant la région cible de *S. lividans* est décrite par Clerc-Bardin et al. (non publié).

TABLEAU 3  
Quantité d'ADN extrait à partir de différents sols après des traitements  
de lyse selon les protocoles n°1 à 5 (µg ADN/g de poids de sol sec ± déviation standard)<sup>a</sup>  
Sols1, 2, 3 et 6; n= 3; sol 4: n=1.

Sol	Protocole de lyse numérob				
	1	2	3	4a	5a
1. Australie	17+/-2	52+/-2	32+/-5	16+/-3	59+/-1
2. Peyrat	29+/-2	58+/-1	40+/-2	29+/-2	56+/-1
3.Côte St-André	36+/-7	60+/-6	148+/-10	94+/-7	73+/-5
4. Chazay	9	16	ND	32	15
6. Dombes	4+/-2	26+/-3	43+/-1	61+/-	160+/-7

<sup>a</sup> Quantification par imagerie de phosphorescence après hybridation sur tâche avec la sonde universelle FGP\$431 (tableau 2).

<sup>b</sup>1: Aucun traitement; 2:broyage à sec du sol (G); 3: Cr + homogénéisation Ultraturax (H);

4a: G + H + sonication Microtip (MT); 4b: G + H+ sonication Cup Horn (CH); 5a: Cr + H + NT + lyse chimique/ enzymatique. Voir aussi figure 1.

<sup>c</sup> ND = Non déterminé.

**Tableau 4 :**  
**Amorces et sondes utilisées dans la caractérisation**  
**moléculaire des ADN extraits du sol**

	Cible (amorce ou sonde)	Séquence (5' - 3')	Position <sup>a</sup>
FGPS 612	Eubactéries (amorce)	C(C/T)AACT(T/C/A)CGTGCCAGCAGCC	506 - 525
FGPS 669	Eubactéries (amorce)	GACGTC(A/G)TCCCC(A/C)CCTTCCTC	1174 - 1194
FGPS 618	Eubactéries (sonde)	ATGG(T/C)TGTCGTCAGCTCG	1056 - 1073
FGPS 614	a-Protéobactéries (sonde)	GTGTAGAGGTGAAATTCGTAG	683 - 703
FGPS 615	b-Protéobactéries (sonde)	CGGTGGATGATGTGGATT	939 - 956
FGPS 616	g-Protéobactéries (sonde)	AGGTTAAACTCAAATGA	900 - 917
FGPS 621	Gram plus à bas GC% (sonde)	ATACGTAGGTGGCAAGCG	532 - 549
FGPS 617	Actinomycètes (sonde)	GCCGGGGTCAACTCGGAGG	1159 - 1149
FGPS 680	Streptomycètes (sonde)	TGAGTCCCCA(A/C/T)C(T/A)CCCCG	1132 - 1149
FGPS 619	Streptosporangium (sonde)	GCTTGGGGCTTAACCTCCAGG	609 - 628

<sup>a</sup> : position sur le gène ARNr16S d'*Escherichia coli*

**Tableau 5 :**  
**Efficacités d'extraction des cellules bactériennes sur gradient de Nycodenz et quantités d'ADN extrait.**  
**Effet de l'incubation de l'échantillon de sol dans une solution d'extrait de levure 6%,**  
**préalablement à la dispersion et à la centrifugation sur gradient de densité.**

	Bactéries extraites	ADN extrait		Actinomycètes cultivables <sup>c</sup> cfu /g sol sec	Lyse directe <sup>d</sup> ng ADN/ g sol sec	Lyse en bloc d'agarose <sup>d,e</sup> ng ADN/ g sol sec
	Microflore totale <sup>a</sup> bactéries /g sol sec	Microflore cultivable <sup>b</sup> cfu /g sol sec				
Sans incubation						
Suspension de sol	1.3 10 <sup>9</sup> (± 0.1)	6.9 10 <sup>6</sup> (± 0.2)		8.6 10 <sup>6</sup> (± 1.2)		
Extrait cellulaire	1.9 10 <sup>8</sup> (± 0.2)	4.1 10 <sup>6</sup> (± 1.5)		2.5 10 <sup>6</sup> (± 0.7)	333 (± 35)	221 (± 70)
Efficacité d'extraction	15%	59%		38%		
Avec incubation dans extrait de levure 6%						
Suspension de sol	1.2 10 <sup>9</sup> (± 0.1)	7.6 10 <sup>7</sup> (± 1.1)		6.6 10 <sup>7</sup> (± 0.4)		
Extrait cellulaire	1.6 10 <sup>8</sup> (± 0.3)	5.3 10 <sup>8</sup> (± 1.4)		3.7 10 <sup>8</sup> (± 0.7)	344 (± 30)	341 (± 67)
Efficacité d'extraction	13%	7%		5%		

<sup>a</sup> : Dénombrement microscopique après coloration à l'acridine orange

<sup>b</sup> : Dénombrement sur milieu solide Trypcase-Soja 10%

<sup>c</sup> : Dénombrement sur milieu solide HV Agar, après enrichissement 20 minutes à 40°C dans une solution d'extrait de levure 6% - SDS 0.05%.

<sup>d</sup> : La quantité d'ADN extrait a été évaluée sur gel d'électrophorèse par rapport à une gamme étalon d'ADN de thymus de veau.

<sup>e</sup> : La quantification a été réalisée après digestion de l'agarose par action d'une b-agarase

5

10

Tableau 6 :

Caractérisation des ADN extraits en fonction de leur proportion en a, b, et g sous classes des Protéobactéries, en Gram + à bas GC% et en Actinomycètes ; le signal d'hybridation avec la sonde procaryote servant de référence 100%.

	a- Protéobactérie s	b- Protéobactérie s	g- Protéobactérie s	Gram+ bas GC%	Actinomycètes	Streptomycètes
Extraction directe <sup>a</sup>	7.7 % ( $\pm 1.4$ )	5.3 % ( $\pm 0.5$ )	3.3 % ( $\pm 0.9$ )	3.1 % ( $\pm 1.7$ )	14.7 % ( $\pm 0.6$ )	0.8 % ( $\pm 0.1$ )
Extraction indirecte						
Lyse + CsCl	10.9 % ( $\pm 1.4$ )	6.4 % ( $\pm 1.4$ )	14.3 % ( $\pm 1.4$ )	7.9 % ( $\pm 1.4$ )	8.5 % ( $\pm 1.4$ )	3.0 % ( $\pm 1.4$ )
Lyse en bloc	2.9 % ( $\pm 1.4$ )	5.4 % ( $\pm 1.4$ )	11.1 % ( $\pm 1.4$ )	8.0 % ( $\pm 1.4$ )	11.3 % ( $\pm 1.4$ )	2.6 % ( $\pm 1.4$ )
Lyse en bloc + incubation YE	6.3 % ( $\pm 1.4$ )	7.5 % ( $\pm 1.4$ )	17.0 % ( $\pm 1.4$ )	18.1 % ( $\pm 1.4$ )	19.4 % ( $\pm 1.4$ )	4.6 % ( $\pm 1.4$ )

a : broyage dans un broyeur à billes de tungstène, à force centrifuge (protocole d'extraction décrit dans article Frostegard et al.)

YE : solution d'extrait de levure à 6%



**Tableau 7:**  
**Diversité des séquences d'ADNr16S contenues dans la banque cosmétique**

N° pool (clone n°)	Voisin identifié le plus proche	% de similarité	Voisin le plus proche (classification, référence)	% de similarité
$\alpha$ -Protéobactéries				
a24.1 (2)	Azospirillum brasilense	97.7%		
a4-a6-a7 (7)	Azospirillum brasilense	95.4%		
a4-a6-a7 (23)	Azospirillum brasilense	88.9%	Str L-87 (a-proteobactérie) <sup>1</sup>	89.8%
a52-a53-a5 (15)	Azospirillum lipoferum	97.6%		
a49-a50-a51 (22)	Agrobacterium tumefaciens	95.0%	Clone JN15d (non publié)	95.5%
a49-a50-a51 (11)	Rhizobium sp	99.7%		
a4-a6-a7 (14)	Rhizobium sp	99.7%		
a30-a31-a32 (7)	Bradyrhizobium japonicum	99.4%		
a19-a20-a26 (5)	Bradyrhizobium genosp	93.3%	Clone DA122 (non publié)	95.9%
a37-a38-a39 (6)	Mesorhizobium sp.	98.9 %		
a19-a20-a26 (9)	Bradyrhizobium sp	90.2%	CloneS-26(aProtéobactérie) <sup>2</sup>	95.9%
a46-a47-a48 (14)	Phyllobacterium rubiacearum	97.6 %		

**TABLEAU 7 (suite 1)**  
**Diversité des séquences d'ADNr16S contenues dans**  
**la banque cosmétique**

N° pool (clone n°)	Voisin identifié le plus proche	% de similarité	Voisin le plus proche (classification, référence)	% de similarité
a49-a50-a51 (1)	Caulobacter henricii	97.0%		
a1-a2-a3 (13)	Caulobacter sp.	96.3%		
a52-a53-a5 (8)	Mesorhizobium mediterraneum	92.1%	Clone DA122 (non publié)	94.8%
a34-a35-a36 (3)	Rhodobium orientis	91.8%	Clone (non publié)	95.1%
a1-a2-a3 (4)	Sphingomonas sp.	94.7%	Clone PAD23 (non publié)	95.1%
a8-a9-a10 (13)	Sphingomonas sp.	94.0%		
$\gamma$ -Protéobactéries				
a40-a41-a42 (13)	Pseudomonas sp	98.9%	clone G26(g-Protéobactérie) <sup>3</sup>	99.7%
a15-a16-a17 (12)	Lysobacter antibioticus	94.4%	clone vadinHA77(g-Protéo) <sup>4</sup>	93.6%
a15-a16-a17 (5)	Xanthomonas sp	93.4%	clone vadinHA77(g-Protéo) <sup>4</sup>	94.6%
a19-a20-a26 (13)	Luteimonas mephitis	92.9%	Souche rJ15 (non publié)	93.5%
a46-a47-a48 (6)	Methylobacter whittenburyi	88.3%	soil clone S-43(g-Protéo) <sup>2</sup>	88.9 %
a11-a12-a13 (11)	Methylobacter whittenburyi	88.3%	soil clone S-43(g-Protéo) <sup>2</sup>	88.9%

**TABLEAU 7 (suite 2)**  
**Diversité des séquences d'ADNr16S contenues dans**  
**la banque cosmétique**

N° pool (clone n°)	Voisin identifié le plus proche	% de similarité	Voisin le plus proche (classification, référence)	% de similarité
a34-a35-a36 (5)	Methylococcus capsulatus	84.9%	soil clone S-12 (d-Protéo) <sup>2</sup>	85.6%
a43-a44-a45 (10)	Legionella birninghamensis	88.9%		
a8-a9-a10 (2)	Lamprocystis roseopersicina	87.5%	Clone 2-100C14 (non publié)	95.1%
$\beta$ -Protéobactéries				
a27-a28-a29 (5)	Rhodocyclus tenuis	90.2%	Clone OPB37 (b-protéo) <sup>5</sup>	91%
$\delta$ -Protéobactéries				
a8-a9-a10 (18)	Nannocystis exedens	92.0%		
a11-a12-a13 (5)	Geobacter sulfurreducens	91.5%		
a27-a28-a29 (8)	Desulfoacinum infernum	88.4%	Clone S-31 (d-Protéo) <sup>2</sup>	89.1 %
a40-a41-a42 (6)	Desulfivibrio aminophilus	85.3%	Clone S-34 (d-Protéo) <sup>2</sup>	86.2%
G+ bas GC%				
a23.1	Kurthia zopfii	97.3%		
a25.1	Kurthia zopfii	97.2%		
a18.1 (22)	Kurthia gipsonii	94.4%	G+ bas GC% non identifié RS19 (non publié)	94.8%

**TABEAU 7 (suite 3)**  
**Diversité des séquences d'ADNr16S contenues dans la banque cosmique**

Actinomycètes				
a33. 1	Cellulomonas sp	99.5%		
a 14.7	Streptosporangium longisporum	99.8%		
a 21.7	Arthrobacter polychromogenes	99.2%		
a8-a9-a10 (7)	Arthrobacter oxydans	98.3%	actinomycète non identifié RSW1 (non publié)	98.5%
a27-a28-a29 (3)	Arthrobacter oxydans	98.9%	actinomycète non identifié RSW1 (non publié)	99.3%
Acidobacterium ?				
a43-a44-a45 (4)	Holophaga foetida	87.3%	Clone 32-10 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	95.0%
a27-a28-a29 (12)	Desulfuromonas acetexigens	88.8%	Clone Sva0515 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	91.0%
a37-a38-a39 (12)	Desulfuromonas palmitatis	90.3%	Clone Sva0515 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	91.5%
a37-a38-a39 (14)	Halothermothrix orenii	87.5%	Clone ii3-7 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	93.3%
a8-a9-a10 (9)	Pelobacter carbinolicus	86.5%	Clone ii3-15 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	92.6%
a34-a35-a36 (10)	Nitrococcus mobilis	90.6%	clone RB43 (Acidobacterium phylum) <sup>6</sup>	93.7%
Non classifié				
a22.1(19)	Aerothermobacter marianus	89.1%	Eubacterie non identifiée (non publié)	93.4%

<sup>1</sup> GONZALEZ et al (1996) - <sup>2</sup>Zhou et al. (1997) - <sup>3</sup>Pederson et al (1996 - <sup>4</sup>Godon et al (1997) - <sup>5</sup>Hugenholtz et al (1998)  
<sup>6</sup>Ludwig (1997)

TABLEAU 9 : Séquences

Désignation	SEQ ID N°
<b>Sondes et amorces</b>	
FGPS431	1
FGPS122	2
FGPS350	3
FGPS643 (T)	4
FGPS643 (C)	5
R499	6
R500	7
C501	8
FGPS516	9
FGPS517	10
FGPS518	11
FGPS612	12
FGPS669	13
FGPS618	14
FGPS614	15
FGPS615	16
FGPS616	17
FGPS621	18
FGPS617	19
FGPS680	20
FGPS619	21
63f	22
1387r	23
Oligo-1 (Exemple 10)	24
Oligo-2 (Exemple 10)	25
A1	26
A2	27
B1	28
B2	29
<b>Acides nucléiques PKS-I</b>	
Amb9	30
Amb12	31
Ery19	32
A9b12	33
A23G1 1-1	34
A26G1 1-2	35
A26G1-10	36

TABLEAU 9 (suite 1): Séquences

Désignation	SEQ ID N°
A35 E4-16	37
A49F1-32	38
A17d2-3	39
A53F11-13	40
A53F11-14	41
A22A 2-11	42
A36E8-1	43
A52E8-2	44
<b>Séquences d'acides aminés PKS-I</b>	
Amb9	45
Amb12	46
Ery19	47
A9b12	48
A23G1 1-1	49
A26G1 1-2	50
A26G1-10	51
A35 E4-16	52
A49F1-32	53
A17d2-3	54
A53F11-13	55
A53F11-14	56
A22A 2-11	57
A36E8-1	58
A52E8-2	59
<b>Séquences ADNr 16S</b>	
a24.1(2),	60
a4.a6.a7 (7)	61
a52.a53.a5(15)	62
a49.a50.a51(11)	63
a4.a6.a7(14)	64
a30.a31.a32(7)	65
a37.a38.a39(6)	66
a46.a47.a48(14)	67
a49.a50.a51(1)	68
a52.a53.a5(8)	69
a8.a9.a10(13)	70
a1.a2.a3(13)	71
a43.a44.a45(10)	72
a27.a28.a29(5)	73

TABLEAU 9 (suite 2): Séquences

Désignation	SEQ ID N°
a23.1	74
a25.1	75
a18.1(22)	76
a33.1	77
a14.7	78
a21.7	79
a8.a9.a10(7)	80
a8.a9.a10(18)	81
a27.a28.a29(3)	82
a34.a35.a36(5)	83
a22.1(19)	84
a11.a12.a13(5)	85
a19.a20.a26(9)	86
a40.a41.a42(6)	87
a27.a28.a29(8)	88
a27.a28.a29(12)	89
a37.a38.a39(12)	90
a46.a47.a48(6)	91
a11.a12.a13(11)	92
a15.a16.a17(12)	93
a15.a16.a17(5)	94
a19.a20.a26(13)	95
a37.a38.a39(14)	96
a8.a9.a10(9)	97
a19.a20.a26(5)	98
a43.a44.a45(4)	99
a1.a2.a3(4)	100
a4.a6.a7(23)	101
a49.a50.a51(22)	102
a8.a9.a10(2)	103
a34.a35.a36(3)	104
a34.a35.a36(10)	105
a40.a41.a42(13)	106

**TABLEAU 9 (suite 3) :****Séquences**

Désignation	SEQ ID N°
<b>Amorces</b>	
cos 1 n (exemple 5)	107
cos 2 n (exemple 5)	108
EV $\phi$ c 31I (exemple 15)	109
BII $\phi$ c 31F (exemple 15)	110
Amorce 1 (exemple 15)	111
Amorce 2 (exemple 15)	112
<b>Acides nucléiques PKS-I</b>	
Cosmide a2641 (vecteur + insert brin (-))	113
Cosmide a2641 (insert - brin (+))	114
orf1	115
orf2	116
orf3	117
orf4	118
orf5	119
orf6	120
<b>Séquences acides aminés PKS-I</b>	
ORF1	121
ORF2	122
ORF3	123
ORF4	124
ORF5	125
ORF6	126



## REFERENCES

- **Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- **Atschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997) " Gapped BLAST and PSI-BLAST : a nex generation of protein databses search programs " *Nucleic Acid Researchs* Vol 25 : 3389-3404
- **Atschul SF et al.,** 1990, *J. Mol Biol*, **215** : 403-410.
- **Bakken, L. R.** 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1482-1487.
- **Bibb MJ, Findlay PR, Johnson MW,** The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences., *Gene* 30: 1-3, 157-66, Oct, 1984.
- **Biesiekierska-Galguen M.** (1997) " Atténuation biologique de contaminants xénobiotiques dans le sol - modèle lindane " Diplôme de DEA National de Toxicologie, Université Claude Bernard Lyon I.
- **Blondelet-Rouault MH, Weiser J, Lebrihi A, Branny P, Pernodet JL.** Institut de Genetique et Microbiologie, URA CNRS 2225, Universite Paris XI, Orsay, France. *Gene* 1997 May 6;190(2):315-7
- **Borchert S et al.,** 1992, *Microbiology Letters*, **92** : 175-180
- **BLONDELET-ROUAULT,** 1997, *Gene*, 315-317.

- **Boccard, F., Smokvina, T. Pernodet, J.L. Friedmann, A. & Guerineau M. (1989)** . The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages. *Embo J* 8,973-80
- **Chatzinotas A., Sandaa R-A., Schönhuber W., Amanna R., Daae F.L., Torsvik V., Zeyer J., Hahn D. (1998)** " Analysis of broad-scale differences in microbial community composition of two pristine forest soils " *Systematic and Applied Microbiology* Vol 21 : 579-587
- **Clegg, C. D., K. Ritz, and B. S. Griffiths. 1997.** Direct extraction of microbial community DNA from humified upland soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:30-33.
- **Clerc-Bardin, S., J.-L. Pernodet, A. Frostegård, and P. Simonet.** Development of a conditional suicide system for a *Streptomyces lividans* strain and its use to investigate conjugative transfer in soil. Submitted.
- **Elledge SJ, Mulligan JT, Ramer SW, Spottswood M, Davis RW.** Department of Biochemistry, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Mar 1;88(5):1731-5
- **Engelen, B., K. Meinken, F. Von Wintzingerode, H. Heuer, H.-P. Malkomes, and H. Backhaus. 1998.** Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2814-2821.
- **Farrelly, V., F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1995.** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2798-2801.
- **Faulkner D.V., Jurka J. (1988)** " Multiple Aligned Sequence Editor (MASE) " *Trends in Biochemical Sciences* Vol 13 : 321-322
- **FRENGEN et al., 1999, Genomics, 58: 250-258.**

- **Frostegård, A., Tunlid, A., and Bååth, E.** 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *J. Microbiol. Meth.* **14**:151-163.
- **Giddings, G.** 1998. The release of genetically engineered micro-organisms and viruses into the environment. *New Phytol.* **140**:173-184.
- **Gladek, A., and J. Zakrzewska.** 1984. Genome size of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**:73-76.
- **Gribskov M, Devereux J, Burgess RR,** The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression., *Nucleic Acids Res* 12: 1 Pt 2, 539-49, Jan 11, 1984.
- **Guiney et al.,** 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **(12)** : 3595-3598.
- **Gourmelen, A. Blondelet-Rouault, M.H. & Pernodet, J.L.** (1998). Characterization of a glycosyl transferase inactivating macrolides, encoded by *gimA* from *Streptomyces ambofaciens*, *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2612-9.
- **Hayakawa, M., and H. Nonomura.** 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**:501-509.
- **Hayakawa, M., Ishizawa K., and H. Nonomura.** 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.* **66**:367-373.
- **Hickey, R. J., and H. D. Tresner.** 1952. A cobalt containing medium for sporulation of *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **64**:891-892.
- **Hintermann, G., R., Cramer, T., and R. Hütter.** 1981. Restriction analysis of the *Streptomyces glaucescens* genome by agarose gel electrophoresis. *Arch. Microbiol.* **130**:218-222.

- **Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm, and J. M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703-711.
- **Hong Fu et al.,** 1995, *Molecular diversity*, **1** : 121-124
- **Hopwood DA, Bibb M J, Chater K F, Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M. and Scrempf H.** 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory manual.* The John Innes Foundation, Norwich, U.K.
- **Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempf.** 1985. *Genetic manipulation of streptomyces - a laboratory manual.* The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- **Hohm B. and Collins J.,** 1980, *Gene*, **11**:291-298.
- **Horinouchi S., Malpartida F., Hopwood D. et Beppu T.,** *Mol. Gen. Genet.* (1989) **215** :355-357.
- **Imai R., Nagata Y., Fukuda M., Takagi M., Yano K.** (1991) "Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane" *Journal of Bacteriology* Vol 177, No21 : 6811-6819
- **Jacobsen, C. S., and O. F. Rasmussen.** 1992. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2458-2462.
- **Jae-Hyuk Y.U. and Leonard T.J.,**1995. Sterigmetscytin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a ... type I polyketide synthase. *J. Bacteriol.* (August) : 4792-4800.

- **Ka, J. O., W. E. Holben, and J. M. Tiedje.** 1994. Analysis of competition in soil among 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1121-1128.
- **Kah-Tong S et al.,** 1997, *J Bacteriol*, G179(23) : **7360-7368**
- **Kimura M.** (1980) " A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences " *Journal of Molecular Evolution* Vol 16 : 111-120
- **Kuske, C. R., K. L. Banton, D. L. Adorada, P. C. Stark, K. K. Hill, and P. J. Jackson.** 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2463-2472.
- **Lacalle RA, Pulido D, Vara J, Zalacain M, Jimenez A.** Centro de Biologia Molecular (CSIC-UAM), Universidad Autonoma, Canto Blanco, Madrid, Spain. *Gene* 1989 Jul 15;79(2):375-80
- **Lee, S.-Y., J. Bollinger, D. Bezdicek, and A. Ogram.** 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3787-3793.
- **Leff, L. G., J. R. Dana, J. V. McArthur, and L. J. Shimkets.** 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1141-1143.
- **Liesack, W., and E. Stackebrandt.** 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**:5072-5078.
- **Liesack, W., P. H. Janssen, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey, and E. Stackebrandt.** 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In* J. D. Van Elsas, J.

T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.), Modern soil microbiology, Marcel Dekker, Inc., New York. (p 375-439)

- **Lorentz, M. G., and W. Wackernagel.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Reviews* 58:563-602.

- **Maidak B.L., Cole J.R., Parker C.T., Garrity G.M., Larsen N., Li B., Lilburn T.G., McCaughey M.J., Olsen G.J., Overbeek R., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M., Woese C.R.** (1999) " A new project of the RDP (Ribosomal Database Project) " *Nucleic Acids Research* Vol 27 : 171-173

- **Mazodier P. et al.,** 1989, *J. Bacteriol.*, **171(6)** : 3583-3585.

- **Moré, M. I., J. B. Herrick, M. C. Silva, W. C. Ghiorse, and E. L. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1572-1580.

- **Murakami T, Holt TG, Thompson CJ,** Unité de Génie Microbiologique, Institut Pasteur, Paris, France. *J. Bacteriol* 1989 Mar;171(3):1459-66

- **Nagata Y., Hatta T., Imai R., Kimbara K., Fukuda M., Yano K., Takagi M.** (1993) " Purification and characterization of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH)dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis* " *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Vol 57 No 9 : 1582-1583

- **Nalin R., Simonet P., Vogel T.M., Normand P.** (1999) " *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen.nov., sp., nov., a lindane-degrading bacterium " *International Journal of Systematic Bacteriology* Vol 49 : 19-23

- **Nesme, X., C. Picard, and P. Simonet.** 1995. Specific DNA sequences for detection of soil bacteria. In J. T. Trevors, and J. D. van Elsas (ed.), *Nucleic acids in the environment, methods and application.* Springer Lab Manual. (p 111-139)

- Nilsson B, Uhlen M, Josephson S, Gatenbeck S, Philipson L. Nucleic Acids Res 1983 Nov 25;11(22):8019-30
- Normand P. et al., 1995, Océanis, 21(1) : 31-56
- Ogram, A. V., M. L. Mathot, J. B. Harsh., J. Boyle, and C. A. Pettigrew, JR. 1994. Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. Appl. Environ. Microbiol. 60:393-396.
- Ogram, A., G. S. Sayler, and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Methods 7:57-66.
- Olsen, R. A., and Bakken, L. R. 1987. Viability of soil bacteria: optimization of the plate-counting technique. Microb. Ecol. 13:59-74.
- Paget, E., L. Jocteur Monrozier, and P. Simonet. 1992. Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. FEMS Microbiol. Lett. 97:31-40.
- Patra, G., P. Sylvestre, V. Ramisse, J. Thérasse, and J.-L. Guesdon. 1996. Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. FEMS Immunol. Medical Microbiology 15:223-231.
- Pernodet J.L. Fish, S. Blondelet-Rouault, M.H. & Cundliffe, E. (1996). The macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes characterized by using a specifically deleted, antibiotic-sensitive strain of *Streptomyces lividans*. Antimicrob Agents Chemother 40, 581, 5.
- Pernodet J.L. , Gourmelen, A., Blondelet-Rouault, M.H. & Cundliffe, E. (1999). Dispensable ribosomal resistance to spiramycin conferred by *smA* in the spiramycin producer *Streptomyces ambofaciens*. 145, 2355-64.
- Picard, C., C. Ponsonnet, X. Nesme, and P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:2717-2722.

- **Preud'homme, J., Belloc, A., Charpentié, Y., and Tarridec, P.** 1965. Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action : la pristinamycine C. R. Acad. Sci. 260 :1309-1312.
- **Priemé, A., J. I. B. Sitaula, A. K. Klemedtsson, and L. R. Bakken.** 1996. Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. FEMS Microbiol. Ecol. 21: 59-68.
- **Prosser, J.** 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. Microbiol. 140:5-17.
- **Raynal A, Tuphile K, Gerbaud C, Luther T, Guérineau M, Pernodet JL ;** Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Institut de Génétique et Microbiologie, URA CNRS 2225, Université Paris-Sud, Orsay, France. Mol Microbiol 1998 Apr;28(2):333-42
- **Raynald A. Tuphile, K. Gerbaud, C., Luther, T. Guerineau, M. & PERNODET, J.L. (1998).** Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: functional analysis in Escherichia coli. Mol. Microbiol 28, 333-42.
- **Richard, G. M.** 1974. Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. Analytical Biochem. 57:369-376.
- **Romanowski, G., M. G. Lorentz, and W. Wackernagel.** 1993. Use of polymerase chain reaction and electroporation of Escherichia coli to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. Appl. Environ. Microbiol. 59:3438-3446.
- **Saitou N., Nei M. (1987)** " The Neighbour-Joining method : a new method for reconstructing phylogentic trees " *Molecular and Biological Evolution* Vol 2 : 112-118



- **Sambrook J., Fritsch E. F. et Maniatis T. 1996.** Molecular cloning : a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- **Senoo K., Wada H. (1989)** " Isolation and identification of an aerobic ?-HCH-decomposing bacterium from soil " *Soil Science, Plant Nutrition* Vol 35, No 1 : 79-87.
- **Sezonov, G., Blanc, V., Bamas-Jacques, N., Friedmann, A. Pernodet, J.L. & Guerineau, M.(1997).** Complete conversion of antibiotic precursor to pristinamycin IIA by overexpression of *Streptomyces pristinae* biosynthetic genes. *Nat Biotechnol* 15,349-53.
- **Shirling, E. B., and D. Gottlieb. 1966.** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16:313-340.  
Shizuga et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89 : 8794-8797.
- **Siefert, J. L., and G. E. Fox. 1998.** Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology* 144:2803-2808.
- **Simonet, P., P. Normand, A. Moiroud, and R. Bardin. 1990.** Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 153:235-240.
- **Smalla, K., N. Cresswell, L. Mendonca-Hagler, A. Wolters, and D. J. van Elsas. 1993.** Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74:78-85.
- **SOSIO M. et al. 2000, Nature Biotechnology, vol.18,:343-345.**

- **Smit, E., P. Leeflang, and K. Wernars.** 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:249-261.
- **Smokvina T, Mazodier P, Boccard F, Thompson CJ, Guérineau M.** Laboratoire de Biologie et Genetique Moleculaire, Universite Paris-Sud, Orsay, France. *Gene* 1990 Sep 28;94(1):53-9
- **Smolvina, T., Mazodier, P. Boccard, F. Thompson, C.J. & Guérineau, M. (1990).** Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94, 53-9.
- **Stackebrandt, E.** 1988. Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. *Can. J. Microbiol.* **34**:552-556.
- **Staneck, J. L., and G. D. Roberts.** 1974. Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**:226-231.
- **Stapleton, R. D., S. Ripp, L. Jimenez, S. Cheol-Koh, J. T. Fleming, I. R. Gregory, and G. S. Sayler.** 1998. Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization. *J. Microbiol. Methods* **32**:165-178.
- **Steffan, R. J., J. Goksøyr, A. K. Bej, and R. Atlas.** 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2908-2915.
- **Tebbe, C. C., and W. Vahjen.** 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2657-2665.

- **Tercero JA, Espinosa JC, Lacalle RA, Jimenez A** . Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Madrid, Spain. *J Biol Chem* 1996 Jan 19;271(3):1579-90
- **Thomas J-C., Berger F., Jacquier M., Bernillon D., Baud-Grasset F., Truffaut N., Normand P., Vogel T.M., Simonet P.** (1996) "Isolation and Characterisation of a novel ?-Hexachlorocyclohexane-degrading bacterium " *Journal of Bacteriology* Vol 178, No20 : 6049-6055
- **Torsvik, V. L.** 1980. Isolation of bacterial DNA from soil. *Soil Biol. Biochem.* 12:15-21.
- **Torsvik, V., R. Sørheim, and J. Goksøyr.** 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* 17:170-178.
- **Tsai, Y.-L., and B. Olson.** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1070-1074.
- **Umeyama T., Tanabe Y., Aigle B.D. et Horinuochi S.,** FEMS (1996) 144 :177-184.
- **Van Elsas, J. D., G. F. Duarte, A. S. Rosado, and K. Smalla.** 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Methods* 32:133-154.
- **Van Elsas, J. D., V. Mäntynen, and A. C. Wolters.** 1997. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biol. Fert. Soils* 24:188-195.
- **Volff JN et al.,** 1996, *Mol. Microbiol.*, 21(5) : 1037-1047.
- **Volossiuk, T., E. J. Robb, and R. N. Nazar.** 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3972-3976.

- **Wahl GM, Lewis KA, Ruiz JC, Rothenberg B, Zhao J, Evans GA.** Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Apr;84(8):2160-4
  - **Waksman, S. A.** 1961. Williams and Wilkins (ed.) The actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species.Vol 2. Baltimore.
  - **Ward, D. M., R. Weller, and M. M. Bateson.** 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature **344**:63-65.
  - **Widmer, F., R. J. Seidler, and L. S. Watrud.** 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Mol. Ecol. **5**:603-613.
  - **Williams, S.T., R. Locci, A. Beswick, D. I. Kurtböke, V. D. Kuznetsov, F. J. Le Monnier, P. F. Long, K. A. Maycroft, R. A. Palma, B. Petrolini, S. Quaroni, J. I. Todd, and M. West.** 1993. Detection and identification of novel actinomycetes. Res. Microbiol. **144**:653-656.
  - **Wilson, I. G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3741-3751.
  - **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. **51**:221-271.
- Yannish-Perron et al., 1985 , Gene, **33(1)** : 103-119.
- **Zaslavsky, B. Y.** 1995. Separation of biomolecules, p. 503-667. *In* Aqueous two-phase partitioning. Boris Y. Zaslavsky (ed.) Physical Chemistry and Bioanalytical Applications, Marcel Dekker, Inc., New York.
  - **Zhou, J., M. A. Bruns, and J. M. Tiedje.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. **62**:316-322.

### REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol contenant des organismes, ledit procédé comprenant la succession d'étapes suivante :

- I (a) Obtention de micro-particules par broyage d'un échantillon de sol préalablement séché ou dessiqué, puis mise en suspension des micro-particules dans un milieu tampon liquide ; et
- (b) extraction des acides nucléiques présents dans les micro-particules ; et
- (c)- passage de la solution contenant les acides nucléiques sur un tamis moléculaire, puis récupération des fractions d'élution enrichies en acides nucléiques et passage des fractions d'élution enrichies en acides nucléiques sur un support de chromatographie d'échange d'anions, puis récupération des fractions d'élution contenant les acides nucléiques purifiés.

2. Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement contenant des organismes, ledit procédé comprenant la succession d'étapes suivante :

- II (i) Obtention d'une suspension par dispersion de l'échantillon de l'environnement en milieu liquide puis homogénéisation de la suspension par agitation douce ; et
- (ii) séparation des organismes et des autres constituants minéraux et/ou organiques de la suspension homogène obtenue à l'étape (i) par centrifugation sur un gradient de densité ; et
- (iii) lyse des organismes séparés à l'étape (ii) et extraction des acides nucléiques ; et
- (iv) purification des acides nucléiques sur un gradient de chlorure de césium.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie d'une étape complémentaire de :

- traitement des micro-particules en suspension dans un milieu tampon liquide par sonication ;

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie des étapes complémentaires suivantes :

- traitement des micro-particules en suspension dans un milieu tampon liquide par sonication ;
- incubation de la suspension à 37°C après sonication en présence de lysozyme et d'achromopeptidase;
- addition de SDS
- récupération des acides nucléiques.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape I-(a) est suivie des étapes complémentaires suivantes :

- homogénéisation des micro-particules à l'aide d'une étape de mixage violent (vortex) suivie d'une étape de simple agitation ;
- congélation de la suspension homogène suivie d'une décongélation ;
- traitement par sonication de la suspension après décongélation ;
- incubation de la suspension à 37°C après sonication en présence de lysozyme et d'achromopeptidase;
- addition de SDS;

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que les acides nucléiques sont des molécules d'ADN.

7. Procédé de préparation d'une collection de vecteurs recombinants, caractérisé en ce que les acides nucléiques obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6 sont insérés dans un vecteur de clonage et/ou d'expression.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les acides nucléiques sont séparés en fonction de leur taille préalablement à leur insertion dans le vecteur de clonage et/ou d'expression.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la taille moyenne des acides nucléiques est rendue sensiblement uniforme par

rupture physique, préalablement à leur insertion dans le vecteur de clonage et/ou d'expression.

10. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur de clonage et/ou d'expression est du type plasmide.

11. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur de clonage et/ou d'expression est du type cosmide.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cosmide réplcatif chez *E. coli* et intégratif chez *Streptomyces*.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOS700I.

14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cosmide conjugatif et intégratif chez *Streptomyces*.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le cosmide est choisi parmi les cosmides pOSV303, pOSV306 et pOSV307.

16. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cosmide réplcatif à la fois chez *E. coli* et chez *Streptomyces*.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOS 700R.

18. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un cosmide réplcatif chez *E. coli* et *Streptomyces* et conjugatif chez *Streptomyces*.

19. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le vecteur de clonage et/ou d'expression est du type BAC.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur BAC intégratif et conjugatif chez *Streptomyces*.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le vecteur est choisi parmi les vecteurs BAC pOSV403, pMBD-1, pMBD-2, pMBD-3, pMBD-4, pMBD-5 et pMBD-6.

22. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce que l'étape d'insertion d'un acide nucléique dans le vecteur de clonage et/ou d'expression comprend les étapes suivantes :

- ouvrir le vecteur de clonage et/ou d'expression à un site de clonage choisi, à l'aide d'une endonucléase de restriction appropriée ;
- ajouter un premier acide nucléique homopolymérique à l'extrémité 3' libre du vecteur ouvert ;
- ajouter un second acide nucléique homopolymérique, de séquence complémentaire au premier acide nucléique homopolymérique, à l'extrémité 3' libre de l'acide nucléique de la collection à insérer dans le vecteur;
- assembler l'acide nucléique du vecteur et l'acide nucléique de la collection par hybridation du premier et du second acide nucléique homopolymérique de séquences complémentaires l'une de l'autre;
- refermer le vecteur par ligation.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que :

- le premier acide nucléique homopolymérique est de séquence poly(A) ou poly (T) ; et
- le second acide nucléique homopolymérique est de séquence poly(T) ou poly(A).

24. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisé en ce que la taille de l'acide nucléique à insérer est d'au moins 100 kilobases, préférentiellement d'au moins 200 kilobases.



25. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que l'acide nucléique à insérer est contenu dans la collection d'acides nucléiques obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6.

26. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce que l'étape d'insertion d'un d'acide nucléique dans le vecteur de clonage et/ou d'expression comprend les étapes suivantes :

- création de bouts francs sur les extrémités de l'acide nucléique de la collection par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes ;
- ouverture du vecteur de clonage et/ou d'expression à un site de clonage choisi, à l'aide d'une endonucléase de restriction appropriée ;
- création de bouts francs aux extrémités de l'acide nucléique du vecteur par élimination des séquences 3' sortantes et remplissage des séquences 5' sortantes, puis déphosphorylation des extrémités 5' ;
- Addition d'adaptateurs oligonucléotidiques complémentaires ;
- insertion de l'acide nucléique de la collection dans le vecteur par ligation.

27. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon la revendication 26, caractérisé en ce que la taille de l'acide nucléique à insérer est d'au moins 100 kilobases, préférentiellement d'au moins 200 kilobases.

28. Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon l'une des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que l'acide nucléique à insérer est contenu dans la collection d'acides nucléiques obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6.

29. Procédé selon l'une des revendications 22 à 28, caractérisé en ce que les acides nucléiques sont insérés tels quels, sans traitement par une ou plusieurs endonucléases de restriction préalablement à leur insertion dans le vecteur de clonage et/ou d'expression.

30. Collection d'acides nucléiques constituée des acides nucléiques obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 6.

31. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il est contenu dans la collection d'acides nucléiques selon la revendication 30.

32. Acide nucléique selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant au moins un opéron, ou une partie d'un opéron.

33. Acide nucléique selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'opéron code pour la totalité ou une partie d'une voie métabolique.

34. Acide nucléique selon la revendication 33, caractérisé en ce que la voie métabolique est la voie de synthèse des polykétides.

35. Acide nucléique selon la revendication 34, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polynucléotides comprenant les séquences SEQ ID N° 30 à 44 et SEQ ID N° 115 à 120.

36. Acide nucléique selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend la totalité d'une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide

37. Acide nucléique selon l'une des revendications 31 à 36, caractérisé en ce qu'il est d'origine procaryote.

38. Acide nucléique selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il provient d'une bactérie ou d'un virus.

39. Acide nucléique selon l'une des revendications 31 à 33 et 36, caractérisé en ce qu'il est d'origine eucaryote.

40. Acide nucléique selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il provient d'un champignon, d'une levure, d'une plante ou d'un animal.

41. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs recombinants suivants :

- a) un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 35 à 40;
- b) un vecteur obtenu selon le procédé de l'une des revendications 22 à 25 et 29;
- c) un vecteur obtenu selon le procédé de l'une des revendications 26 à 29.

42. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOS 700I.

43. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOSV303.

44. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOSV306.

45. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOSV307.

46. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du cosmide pOS 700R.

47. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur BAC pOSV403.

48. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-1.

49. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-2.

50. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-3.

51. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-4.

52. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-5.

53. Vecteur caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMBD-6.

54. Collection de vecteurs recombinants tels qu'obtenus selon le procédé de l'une des revendications 7 à 21, 25 et 28.

55. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression caractérisé en ce qu'il est contenu dans la collection de vecteurs recombinants selon la revendication 54.

56. Cellule hôte recombinante comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 31 à 40 ou un vecteur recombinant selon la revendication 55.

57. Cellule hôte recombinante selon la revendication 56, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote ou eucaryote.

58. Cellule hôte recombinante selon la revendication 57, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie.

59. Cellule hôte recombinante selon la revendication 58, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie choisie parmi *E. coli* et *Streptomyces*.

60. Cellule hôte recombinante selon la revendication 58, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure ou d'un champignon filamenteux.

61. Collection de cellules hôtes recombinantes, chacune des cellules hôtes constitutives de la collection comprenant un acide nucléique de la collection d'acides nucléiques selon la revendication 30.

62. Collection de cellules hôtes recombinantes, chacune des cellules hôtes constitutives de la collection comprenant un vecteur recombinant selon l'une des revendications 41 ou 55.

63. Procédé de détection d'un acide nucléique de séquence nucléotidique déterminée, ou de séquence nucléotidique structurellement apparentée à une séquence nucléotidique déterminée, dans une collection

de cellules hôtes recombinantes selon l'une des revendications 61 ou 62, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mettre en contact la collection de cellules hôtes recombinantes avec un couple d'amorces hybridant avec la séquence nucléotidique déterminée ou hybridant avec la séquence nucléotidique structurellement apparentée à une séquence nucléotidique déterminée ;
- réaliser au moins trois cycles d'amplification ;
- détecter l'acide nucléique éventuellement amplifié..

64. Procédé de détection d'un acide nucléique de séquence nucléotidique déterminée, ou de séquence nucléotidique structurellement apparentée à une séquence nucléotidique déterminée, dans une collection de cellules hôtes recombinantes selon l'une des revendications 61 ou 62, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- mettre en contact la collection de cellules hôtes recombinantes avec une sonde hybridant avec la séquence nucléotidique déterminée ou hybridant avec une séquence nucléotidique structurellement apparentée à la séquence nucléotidique déterminée ;
- détecter l'hybride éventuellement formé entre la sonde et les acides nucléiques compris dans les vecteurs de la collection.

65. Procédé pour identifier la production d'un composé d'intérêt par une ou plusieurs cellules hôtes recombinantes dans une collection de cellules hôtes recombinantes selon l'une des revendications 61 ou 62, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- culture des cellules hôtes recombinantes de la collection dans un milieu de culture approprié ;
- détection du composé d'intérêt dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire d'une ou plusieurs des cellules hôtes recombinantes cultivées.

66 Procédé pour sélectionner une cellule hôte recombinante produisant un composé d'intérêt dans une collection de cellules hôtes

recombinantes selon l'une des revendications 61 ou 62, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- culture des cellules hôtes recombinantes de la collection dans un milieu de culture approprié ;
- détection du composé d'intérêt dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire d'une ou plusieurs des cellules hôtes recombinantes cultivées.
- sélection des cellules hôtes recombinantes produisant le composé d'intérêt.

67. Procédé pour la production d'un composé d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- cultiver d'une cellule hôte recombinante sélectionnée selon le procédé de la revendication 66;
- récupérer et, le cas échéant, purifier, le composé produit par ladite cellule hôte recombinante.

68. Composé d'intérêt caractérisé en ce qu'il est obtenu selon le procédé de la revendication 67.

69. Composé selon la revendication 68, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polykétide.

70. Polykétide caractérisé en ce qu'il est produit grâce à l'expression d'au moins une séquence nucléotidique comprenant une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N°30 à 44 et SEQ ID N°115 à 120.

71. Composition comprenant un polykétide selon la revendication 69 ou 70.

72. Composition pharmaceutique comprenant une quantité pharmacologiquement active d'un polykétide selon la revendication 69 ou 70, en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible.

73. Procédé de détermination de la diversité des acides nucléiques contenus dans une collection d'acides nucléiques et tout particulièrement d'une collection d'acides nucléiques provenant d'un échantillon de l'environnement, préférentiellement d'un échantillon du sol, ledit procédé comprenant les étapes suivantes:

- mise en contact des acides nucléiques de la collection d'acides nucléiques à tester avec un couple d'amorces oligonucléotidiques hybridant à toute séquence d'ADN ribosomal 16 S bactérien;

- réalisation d'au moins trois cycles d'amplification;

- détection des acides nucléiques amplifiés à l'aide d'une sonde oligonucléotidique ou d'une pluralité de sondes oligonucléotidiques, chaque sonde hybridant spécifiquement avec une séquence d'ADN ribosomal 16 S commune à un règne, un ordre, une sous-classe ou un genre bactérien;

- le cas échéant, comparer les résultats de l'étape de détection précédente avec les résultats de détection, à l'aide de la sonde ou de la pluralité de sondes, d'acides nucléiques de séquence connue constituant une gamme étalon.

74. Procédé selon la revendication 73, caractérisé en ce que le couple d'amorces hybridant à toute séquence d'ADN ribosomal 16 S bactérien est constitué de l'amorce FGPS 612 (SEQ ID N°12) et de l'amorce FGPS 669 (SEQ ID N°13).

75. Procédé selon la revendication 73, caractérisé en ce que le couple d'amorces hybridant à toute séquence d'ADN ribosomal 16 S bactérien est constitué de l'amorce 63 f (SEQ ID N°22) et de l'amorce 1387 (SEQ ID N°23).

76. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique d'ADNr 16S choisie parmi les séquences possédant au moins 99% d'identité en nucléotides avec les séquences SEQ ID N° 60 à SEQ ID N° 106.

77. Procédé de production d'une polykétide synthase de type I, ledit procédé de production comprenant les étapes suivantes:

- obtention d'une cellule hôte recombinante comprenant un acide nucléique codant pour une polykétide synthase de type I comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences SEQ ID N°33 à SEQ ID N°44, SEQ ID N°30 à SEQ ID N°32 et SEQ ID N° 115 à SEQ ID N°120.

- culture des cellules hôtes recombinantes dans un milieu de culture approprié;

- récupération et, le cas échéant, purification de la polykétide synthase de type I à partir du surnageant de culture ou du lysat cellulaire.

78. Polykétide synthase comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID N°45 à 59 et SEQ ID N° 121 à SEQ ID N°126.

79. Anticorps dirigé contre une polykétide synthase selon la revendication 78.

80. Procédé de détection d'une polykétide synthase de type I ou d'un fragment peptidique de cette enzyme, dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes de:

a) mettre en contact un anticorps selon la revendication 79 avec l'échantillon à tester;

b) détecter le complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

81. Nécessaire de détection d'une polykétide synthase de type I dans un échantillon comprenant:

a) un anticorps selon la revendication 79;

b) le cas échéant, des réactifs nécessaires à la détection du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.



Sol sec et tamisé

- 
- ```
graph TD; A[Sol sec et tamisé] --> B[1. Détermination de l'ADN extracellulaire:  
Homogénéisation de la suspension de sol (Vortex)]; A --> C[2. Broyage du sol sec.]; C --> D[3. Homogénéisation de la suspension de sol]; D --> E[4a. Sonication à l'aide d'une micro-pointe]; D --> F[4b. Sonication à l'aide du dispositif Cup Horn]; E --> G[5a. Lyse par le lysozyme et le SDS]; F --> H[5b. Lyse sur le lysozyme et le SDS];
```
1. Détermination de l'ADN extracellulaire:  
Homogénéisation de la suspension de sol (Vortex)
  2. Broyage du sol sec.
    3. Homogénéisation de la suspension de sol
      - 4a. Sonication à l'aide d'une micro-pointe
        - 5a. Lyse par le lysozyme et le SDS
      - 4b. Sonication à l'aide du dispositif Cup Horn
        - 5b. Lyse sur le lysozyme et le SDS

FIG. 1

2/38

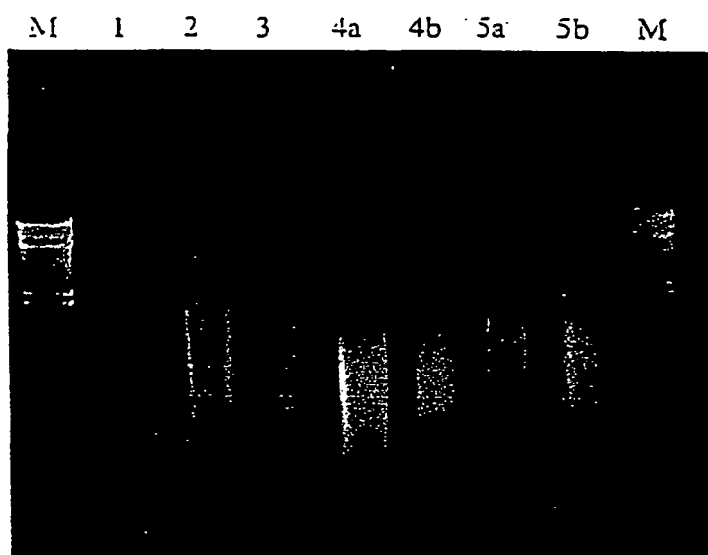


Figure 2

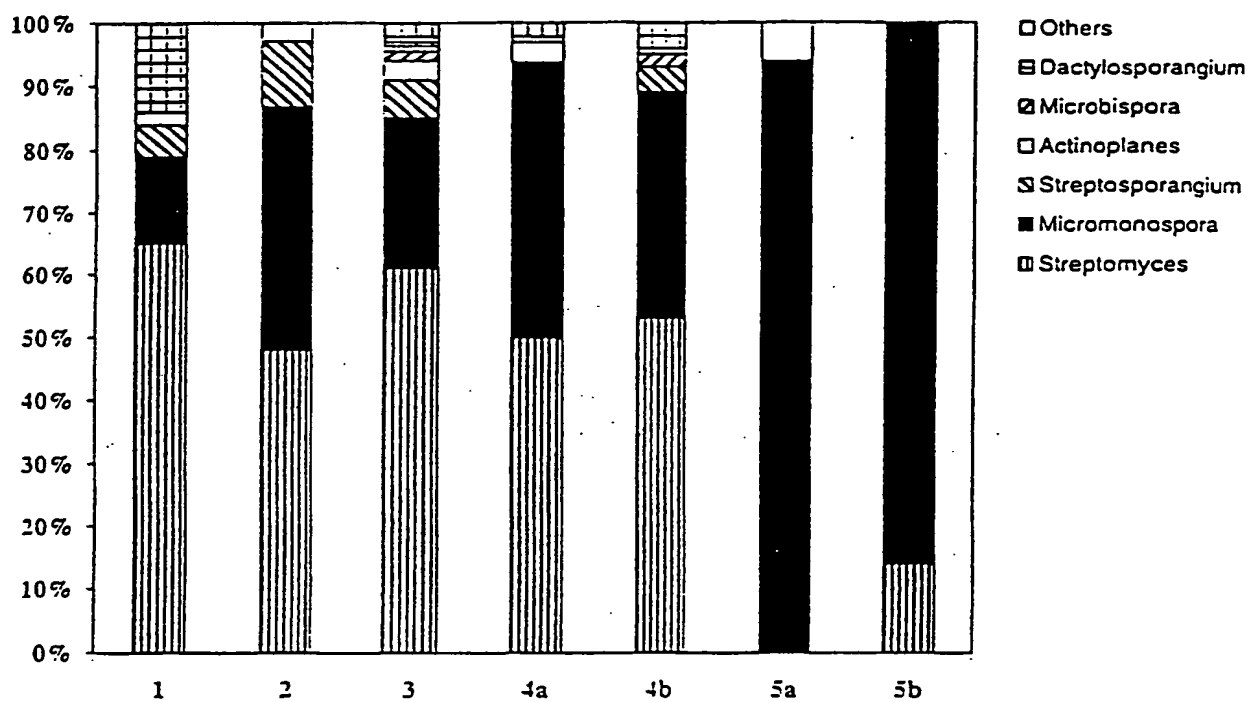


Figure 3

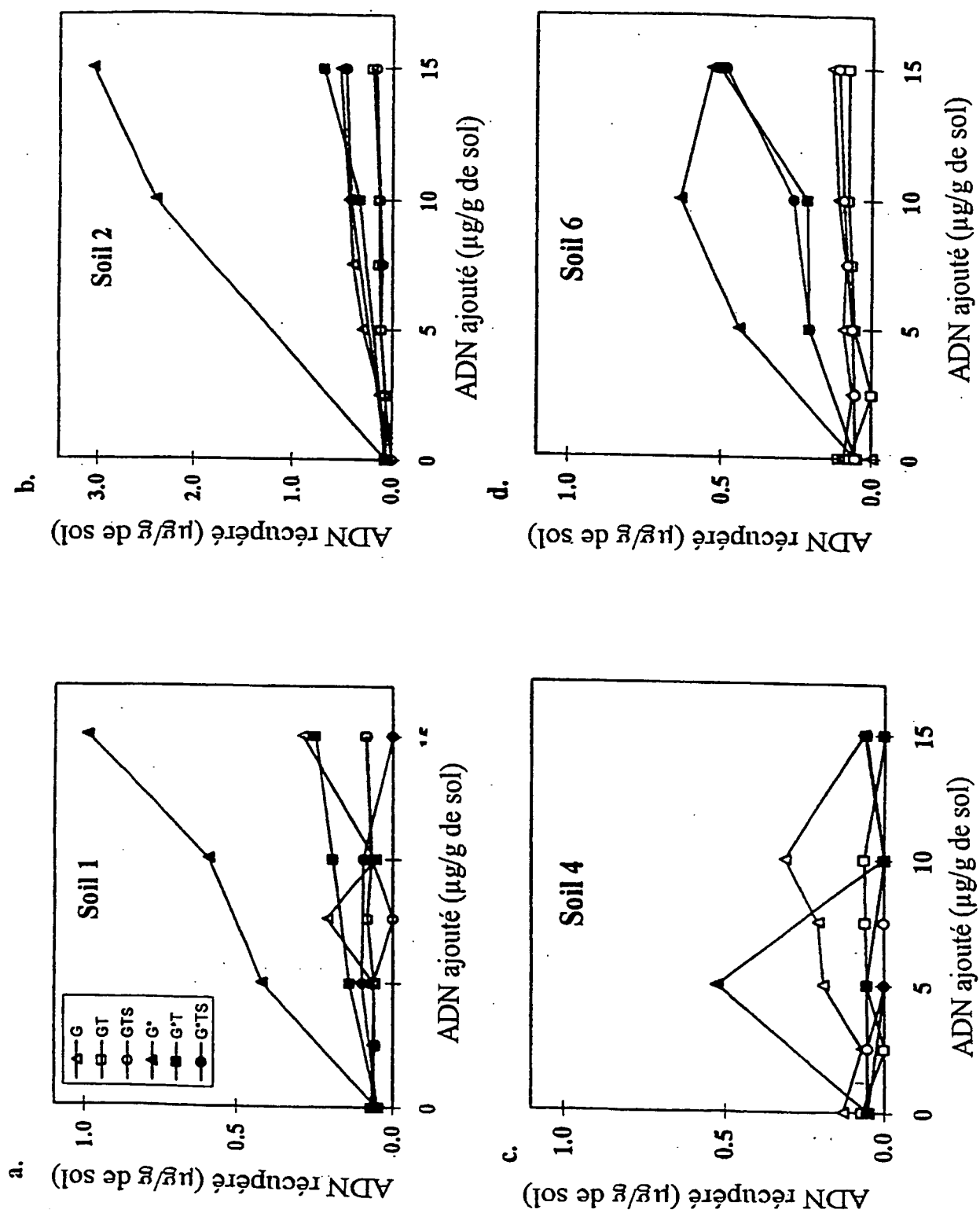


Figure 4

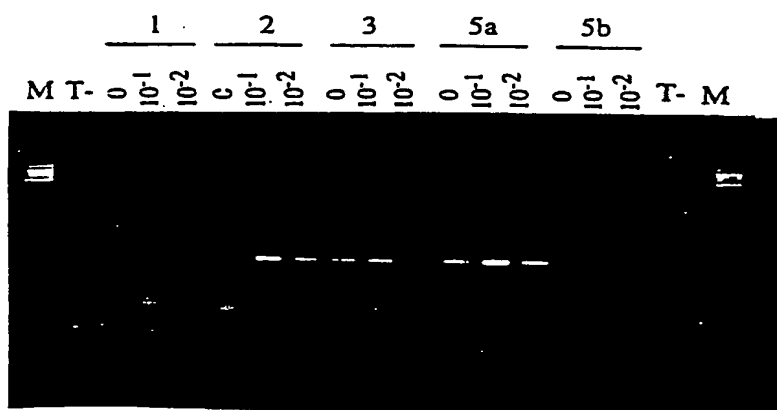


Figure 5

6/38

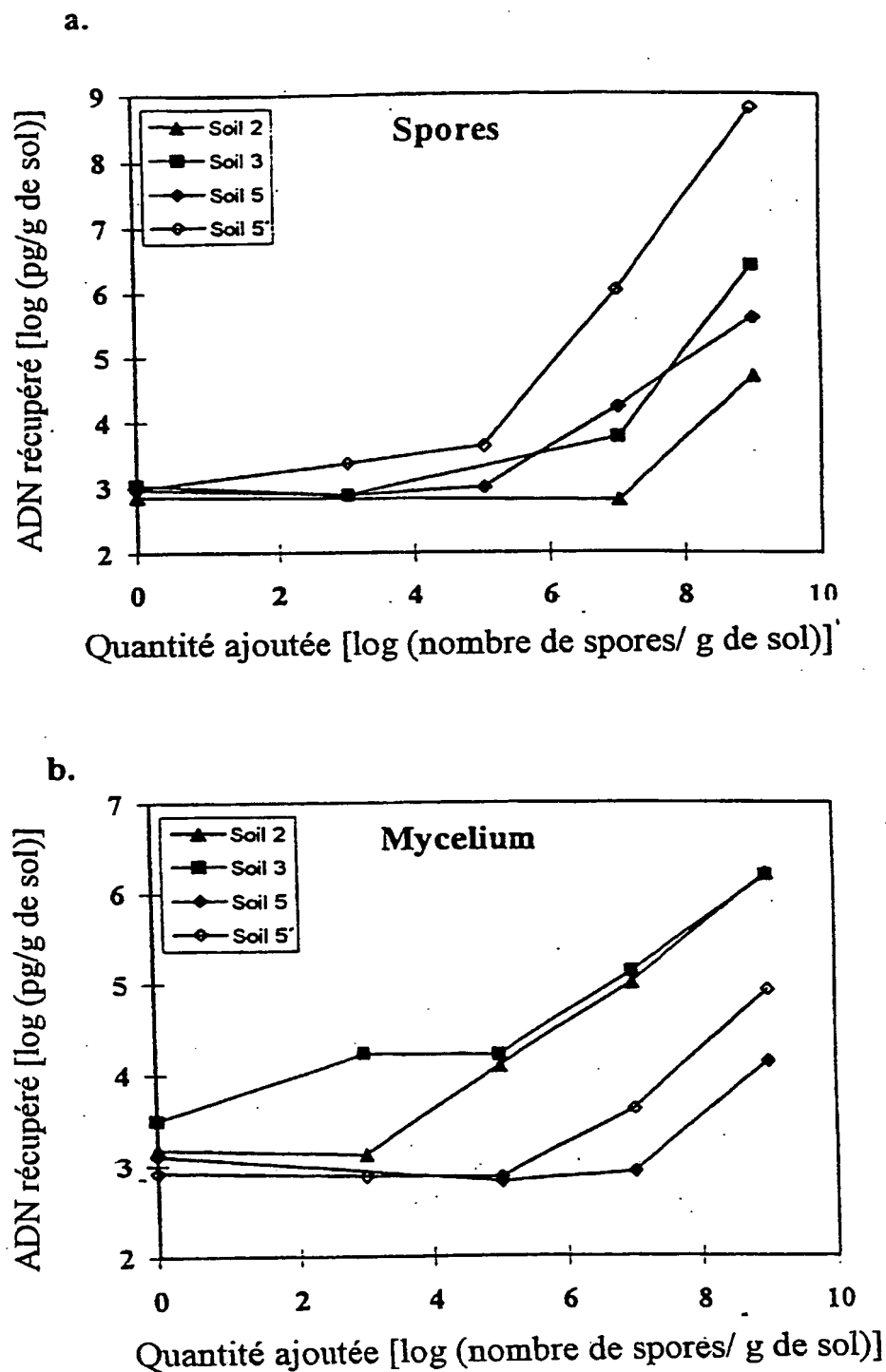


Figure 6

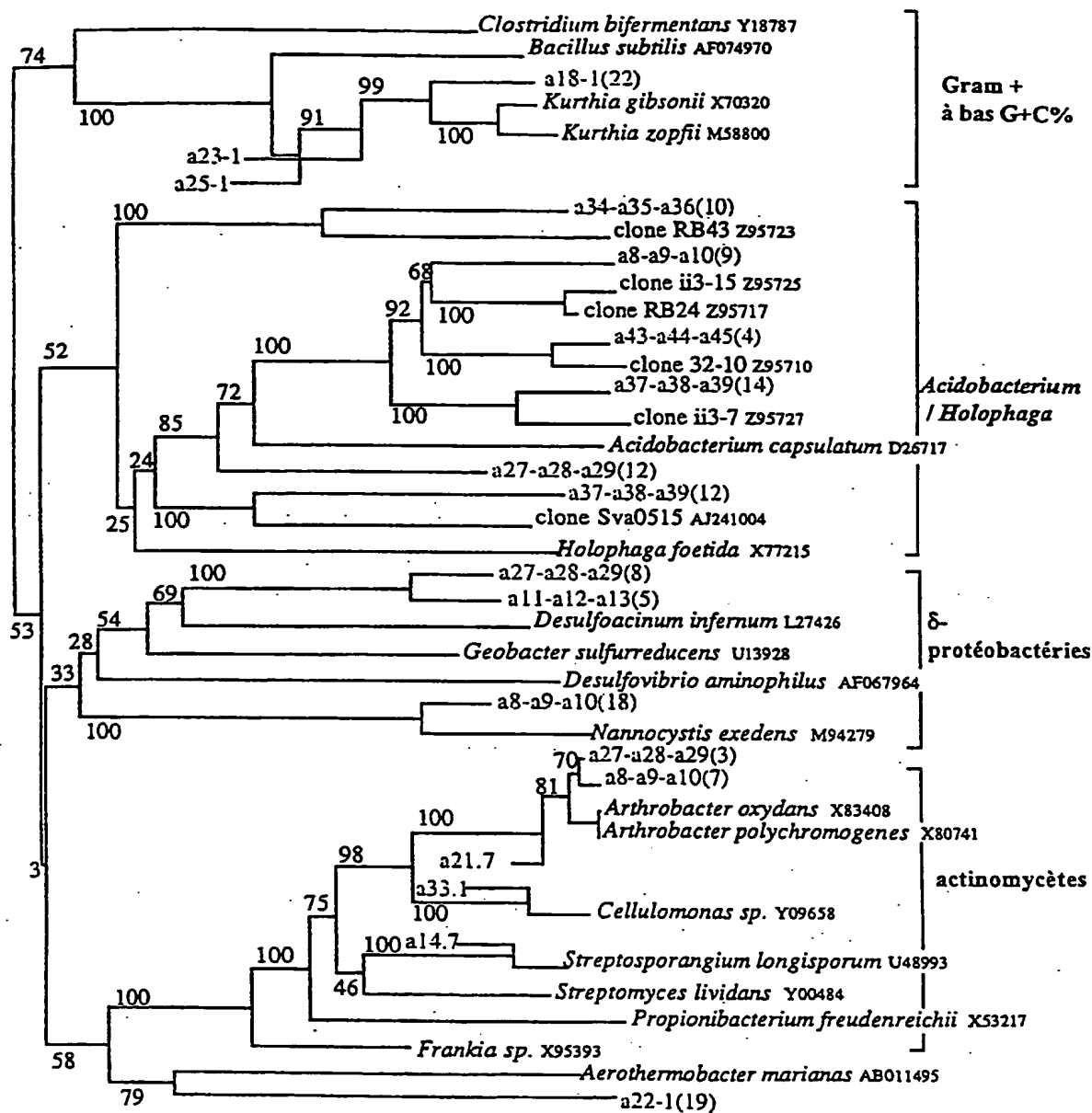


Figure 7- a)

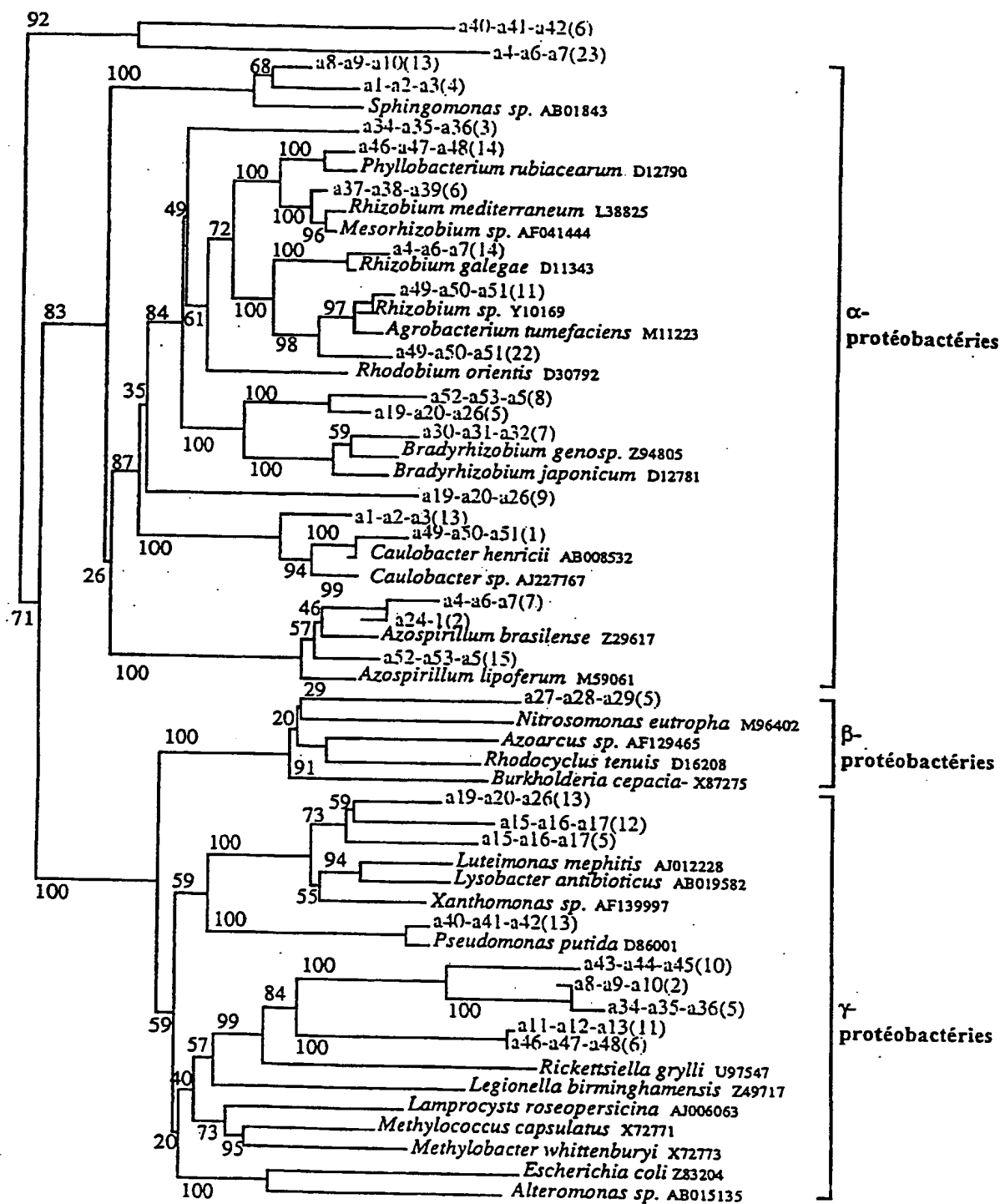


Figure 7 - b)



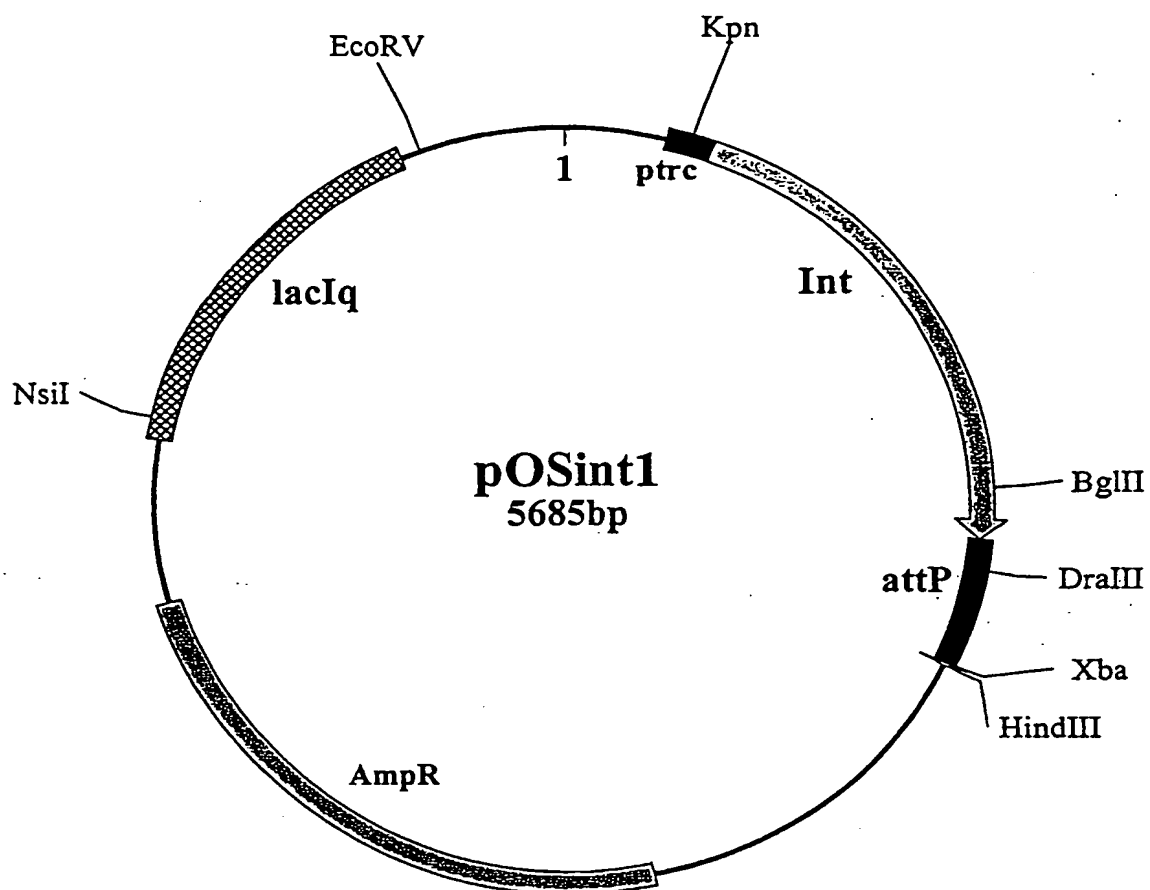


Figure 8

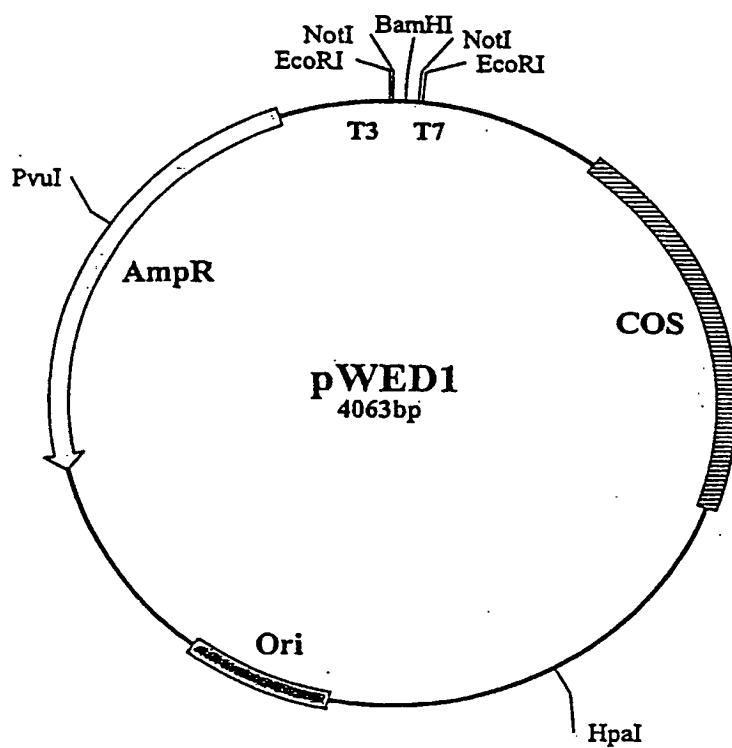


FIGURE 9

11/38

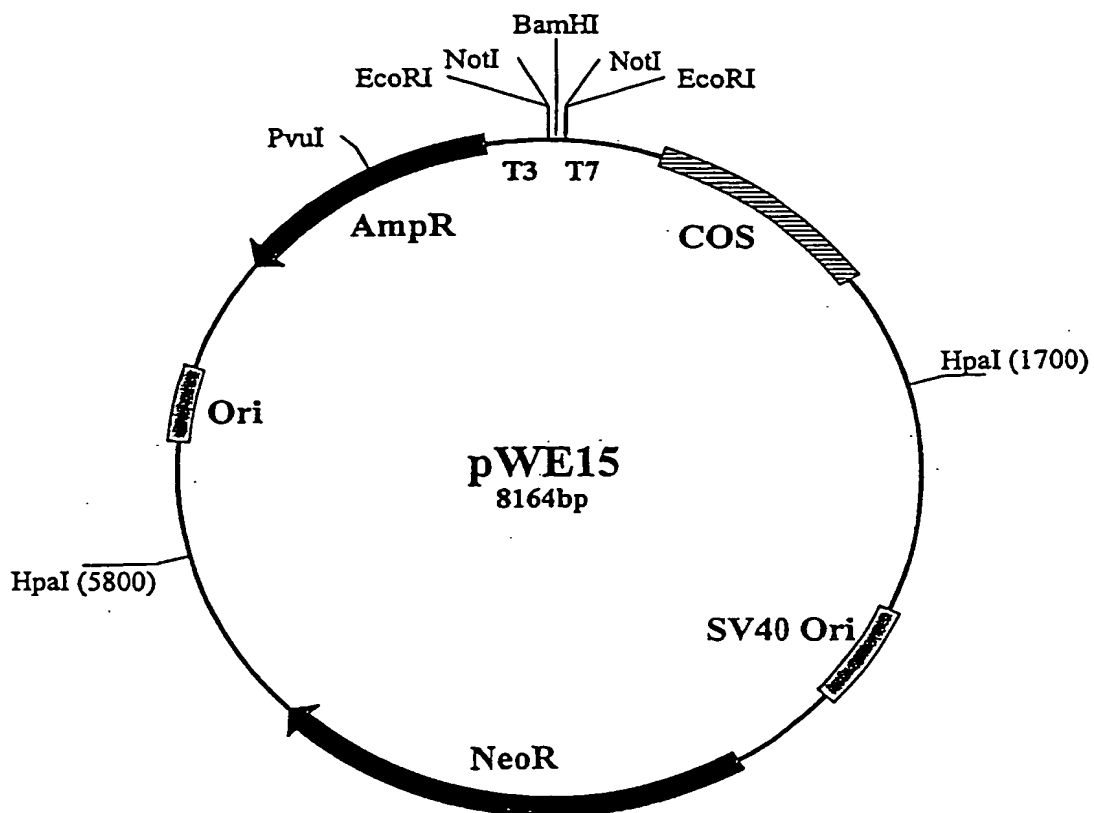


Figure 10

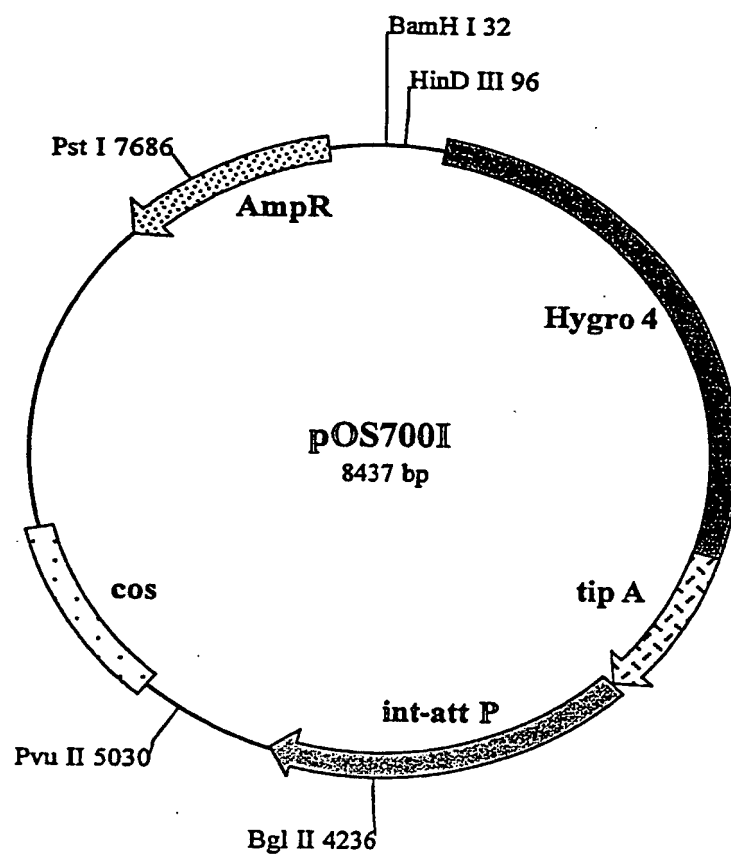


Figure 11

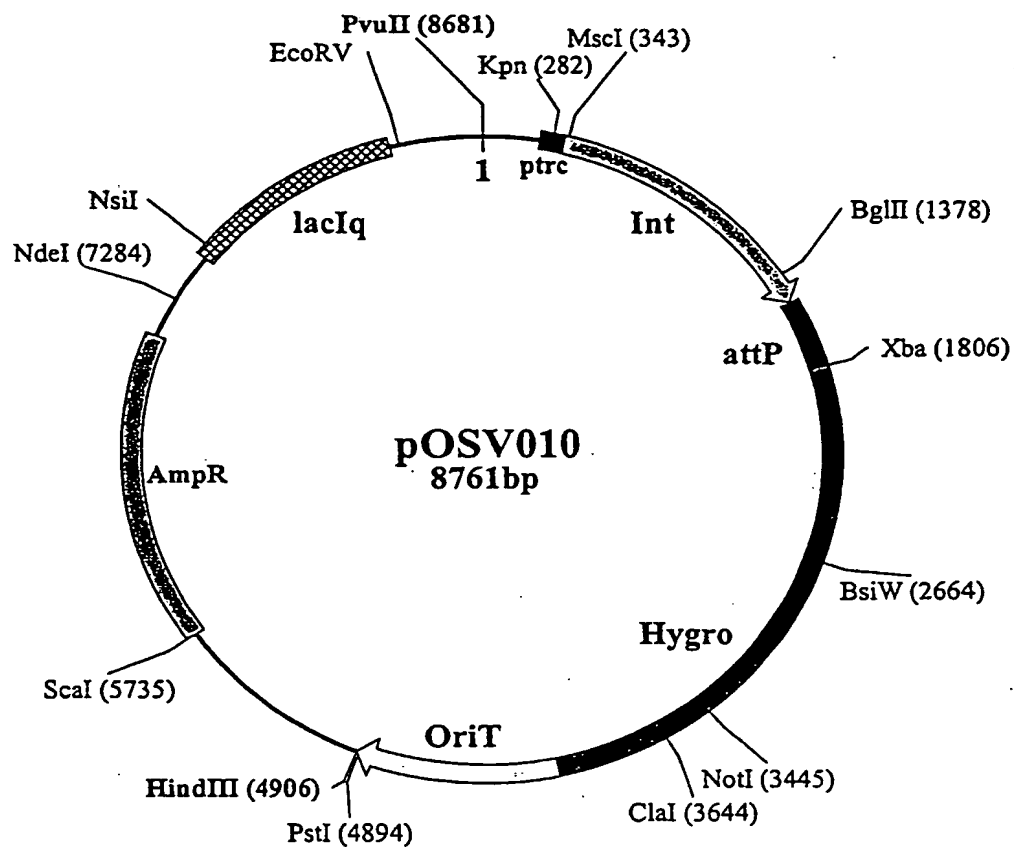
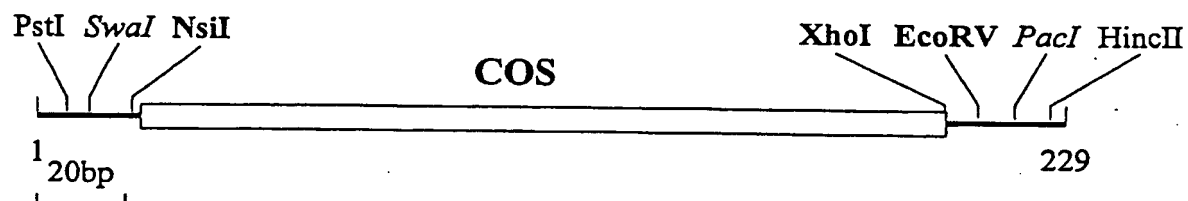


Figure 12

14/38



## PCR COS

Figure 13.

15/38

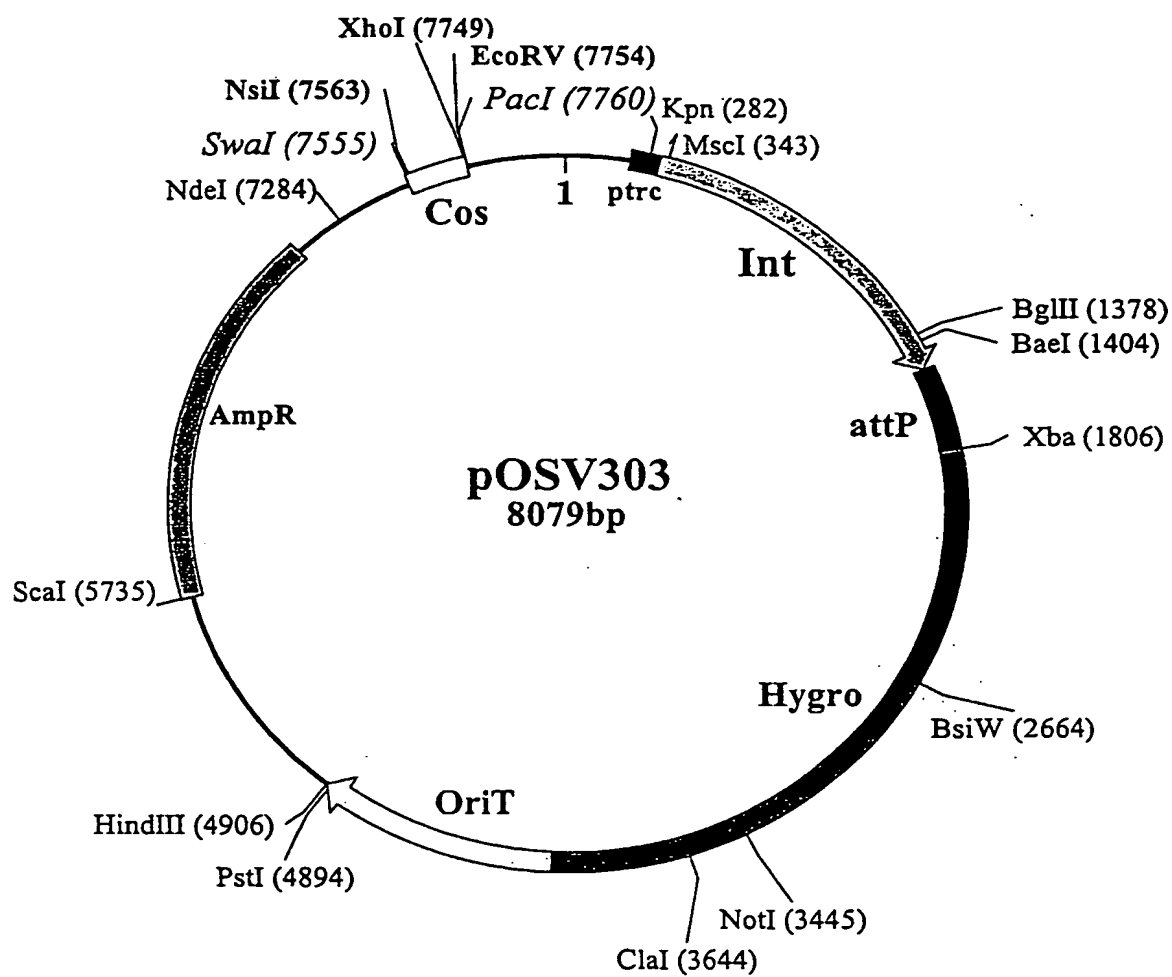


Figure 14

16/38

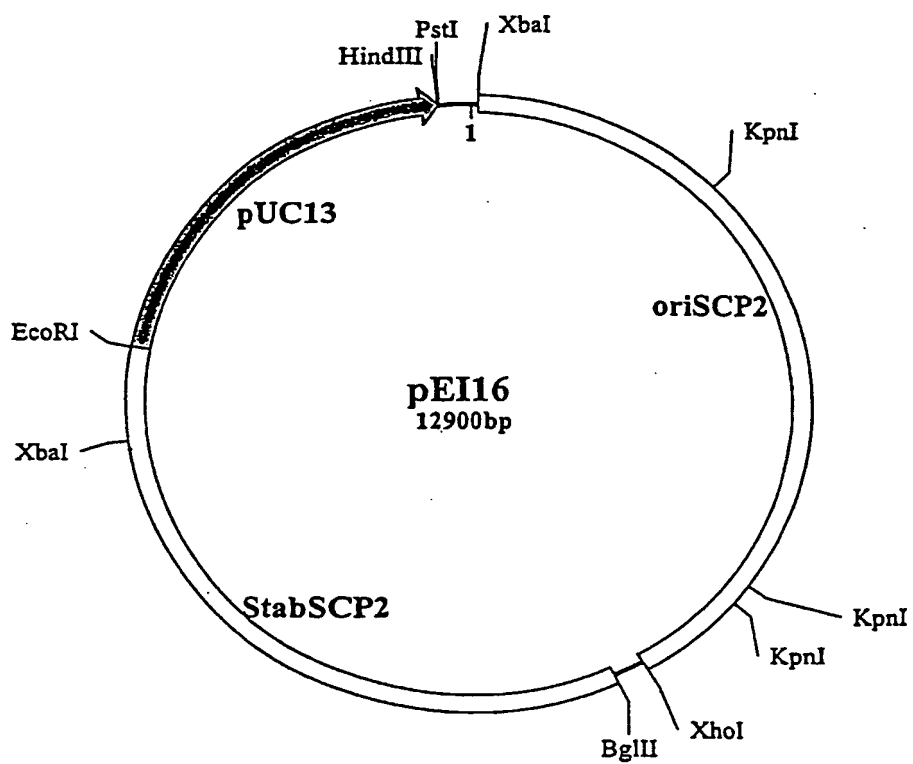


FIGURE 15



17/38

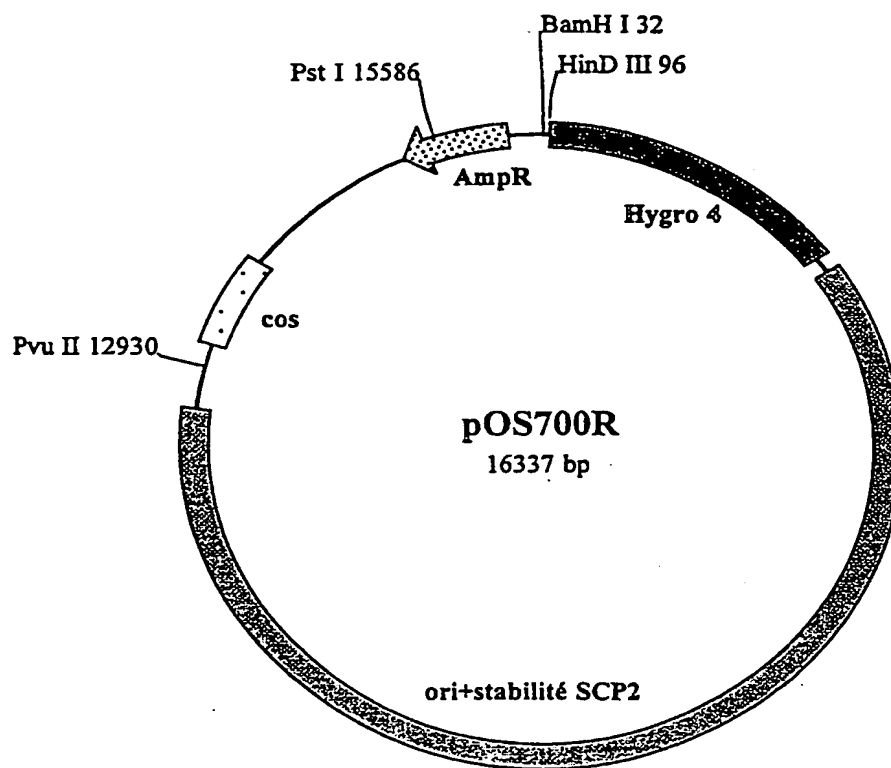


Figure 16

18/38

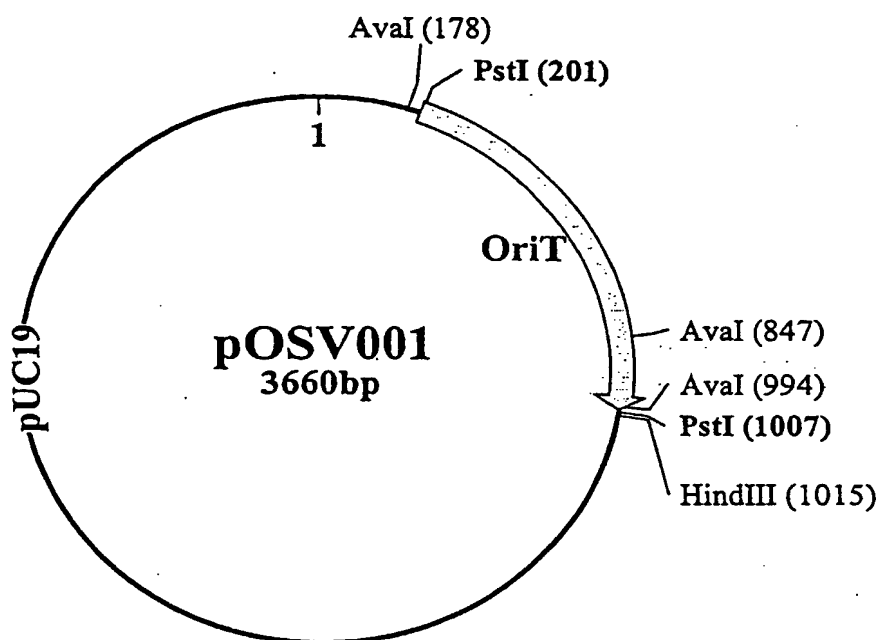


Figure 17

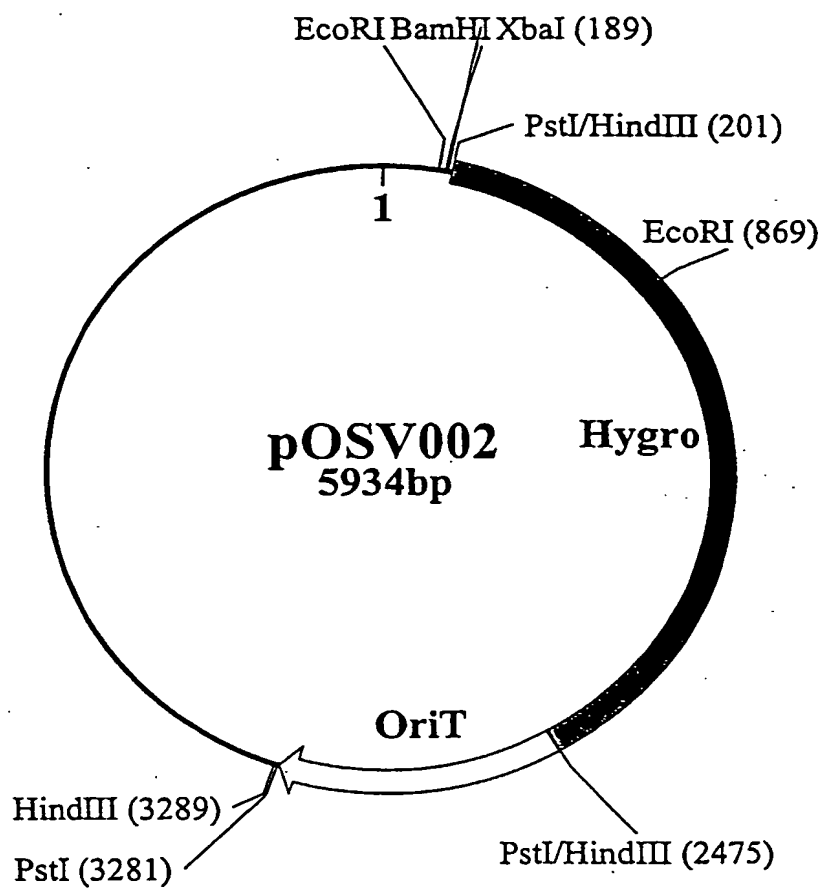


Figure 18

20/38

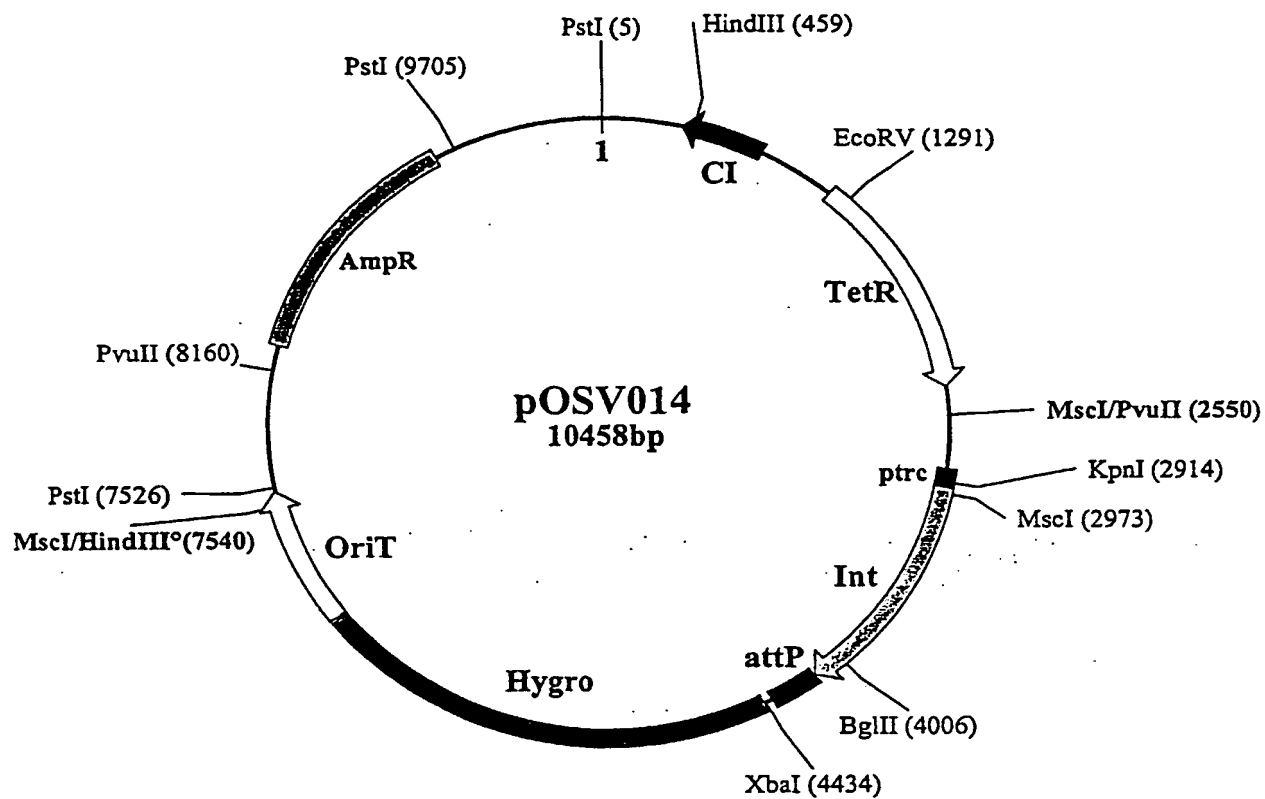


Figure 19

21/38

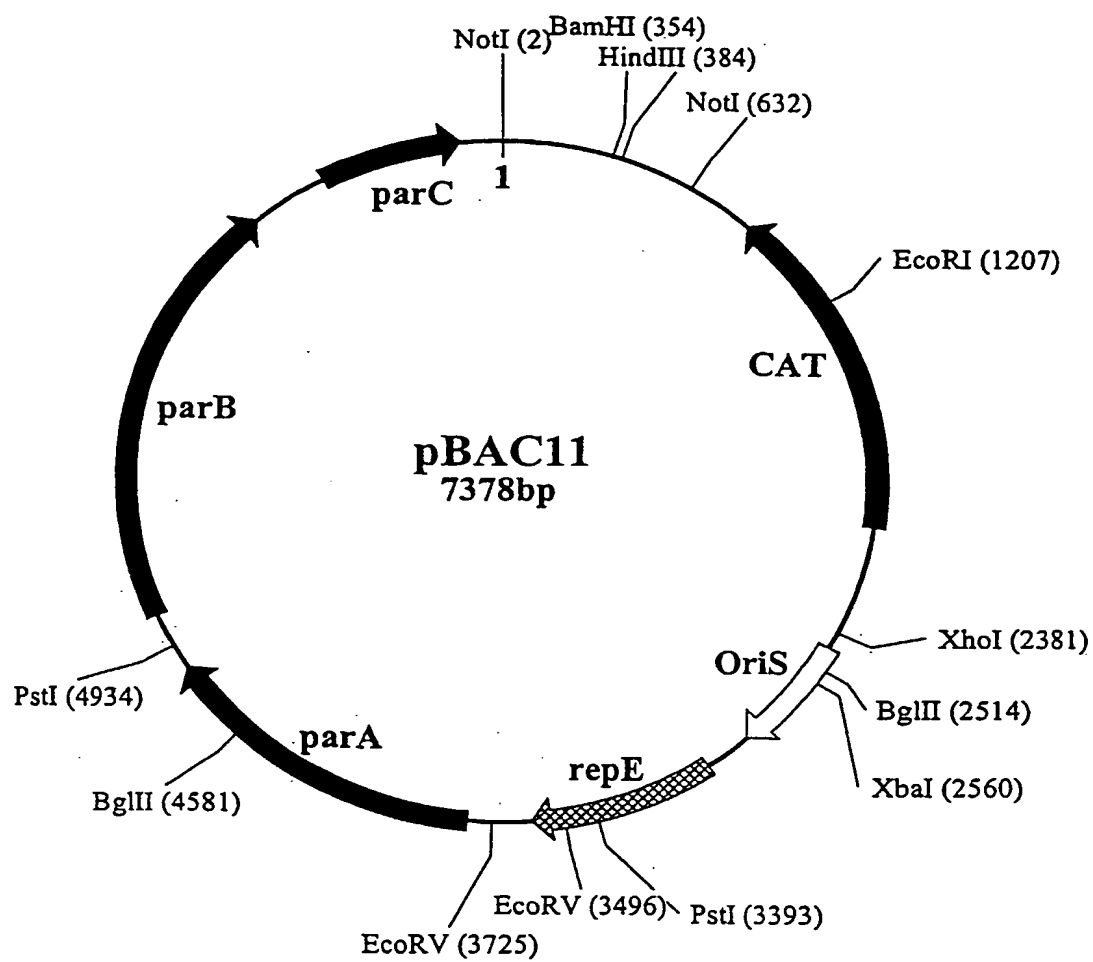


Figure 20

22/38

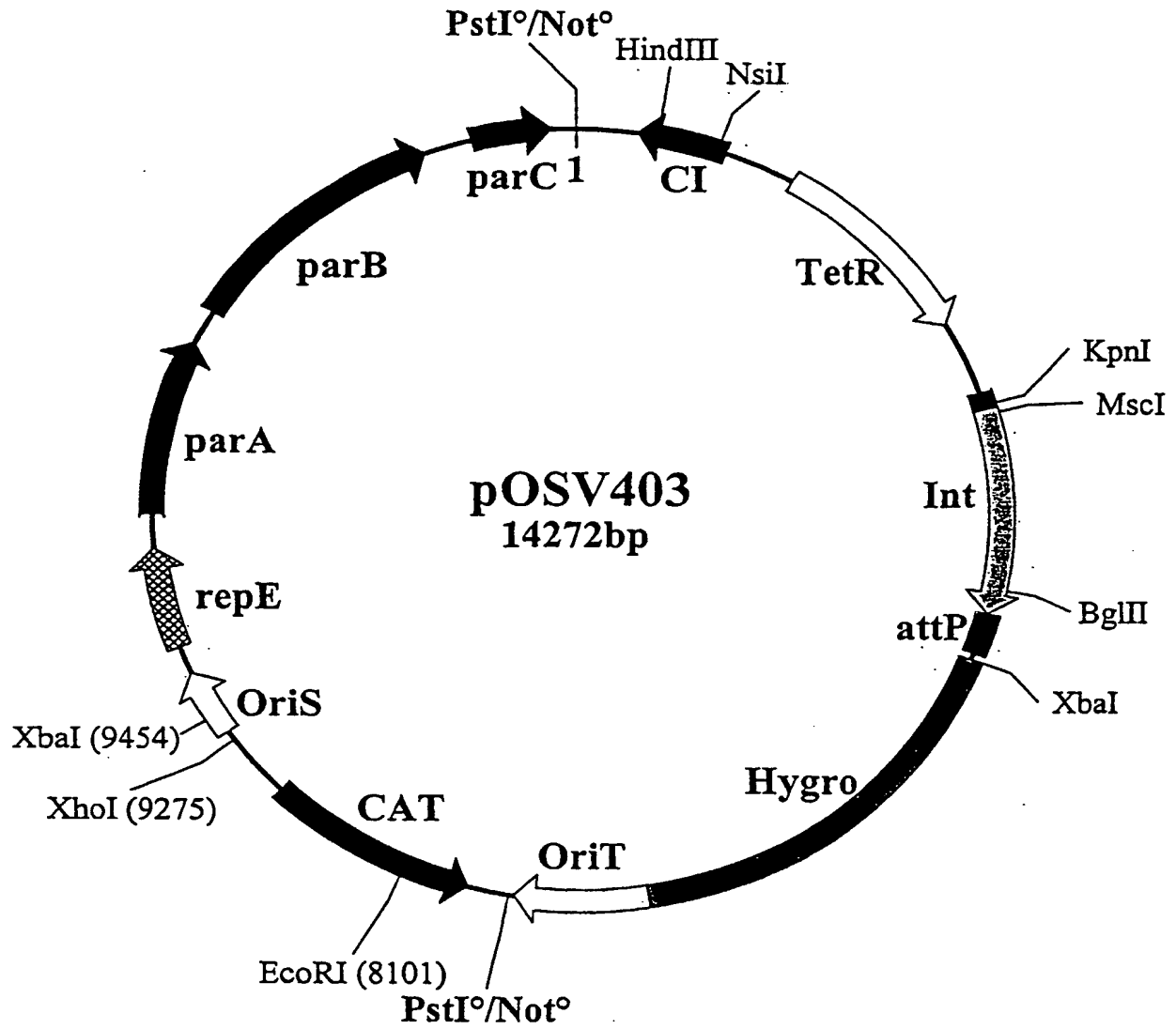


Figure 21

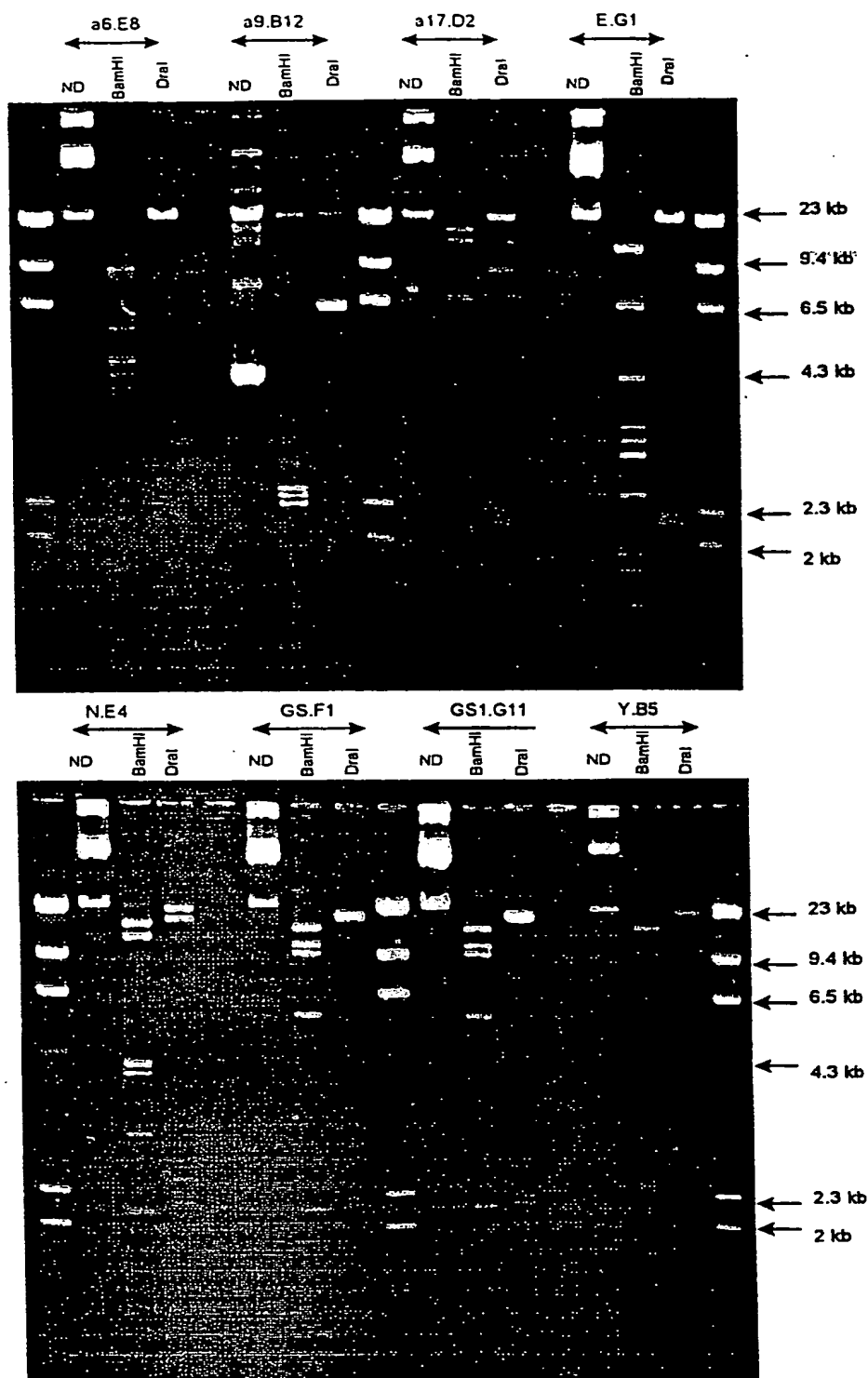


Figure 22

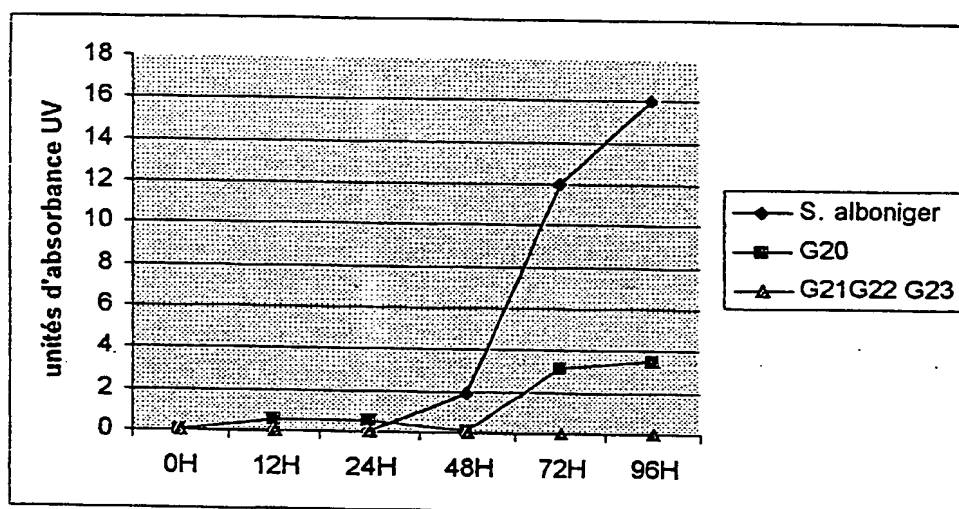


Figure 23



|                        |             |            |            |            |            |
|------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 101                    |             |            |            |            | 150        |
| sol_a26G1-1            | KDFLATRVSY  | KLNLRGPSLT | VQTACSTSLV | SVVMACESLQ | RGASDIALAG |
| sol_a46B5-31           | KDYLPTRVSY  | KLNLRGPSLA | VQSACSTGLV | AVCQAIQNLQ | TYQCDMALAG |
| sol_a9B12-3            | KDFIATRTAY  | KLNLRGPAMA | VGACSTSLV  | AVHEACQALR | LGECDMALAG |
| sol_a49F1-32           | KDFLATRTAY  | KLNLRGPAMT | VQTACSSSLV | AVHVAAQSLL | AGECDIALAG |
| <i>B. subtilis</i>     | SGTIPTMISH  | KLGLRGPSYF | VHANCSSSLI | GLHSAYKSLL | SGESDYALVG |
| stramb12               | GSVLSGRIAY  | TFGLQGPAVT | VDACSSSLV  | ALHLAAQALP | AGECELALVG |
| stramb9                | AAVLSGRVSY  | AFGLEGPAVT | VDACSSSLV  | ALHLAAQALR | RGECDLALAG |
| EryA (module 1)        | TSVASGRIAY  | TLGLEGPAIS | VDACSSSLV  | AVHLACQSLR | RGESSLAMAG |
| sol_a26G1-2            | FSTAAGRISY  | LLGLQGPNEP | VDACSSSLV  | AVHLACRSIQ | SRECSMALAG |
| sol_a53F11-13          | LNAAAGRISY  | VLGLQGPSMA | VDACPSSLV  | AIHLACQSLR | NRECRMALAG |
| sol_a53F11-14          | HSIAAGRILAY | VLGLQGPAMA | VDACSSSLV  | AIHLACQSLR | NDDCRVAVAG |
| sol_a26G1-10           | HSMLANRISY  | LLDLRGPSMA | VDACSSALV  | AVHLACQSLR | RRECDAAFAG |
| sol_a36E8-1            | LSIAANRLSY  | TFDFRGPSLA | VDACSSSLV  | AIHLACQSVR | RGEAELAVAA |
| <i>M. tuberculosis</i> | MSIIANRLSY  | FLDLRGPSVA | VDACSSSLV  | AIHLACQSLR | TQDCHLAIAA |
| sacery19               | LSIIPARIAY  | FLGLRGPDMT | LNTACSSALV | AMHQARQSIL | LGESSVALVG |
| sol_a17D2-3            | LAVVANRISY  | IYDLRGPSLT | VDACSSSLV  | ALHQAVEALR | SGRIETAIVG |
| <i>fas humaine</i>     | RAMMANRLSF  | FFDFRGPSIA | LDTACSSSLM | ALQNAVQAIH | SGQCPAAIVG |

Figure 24

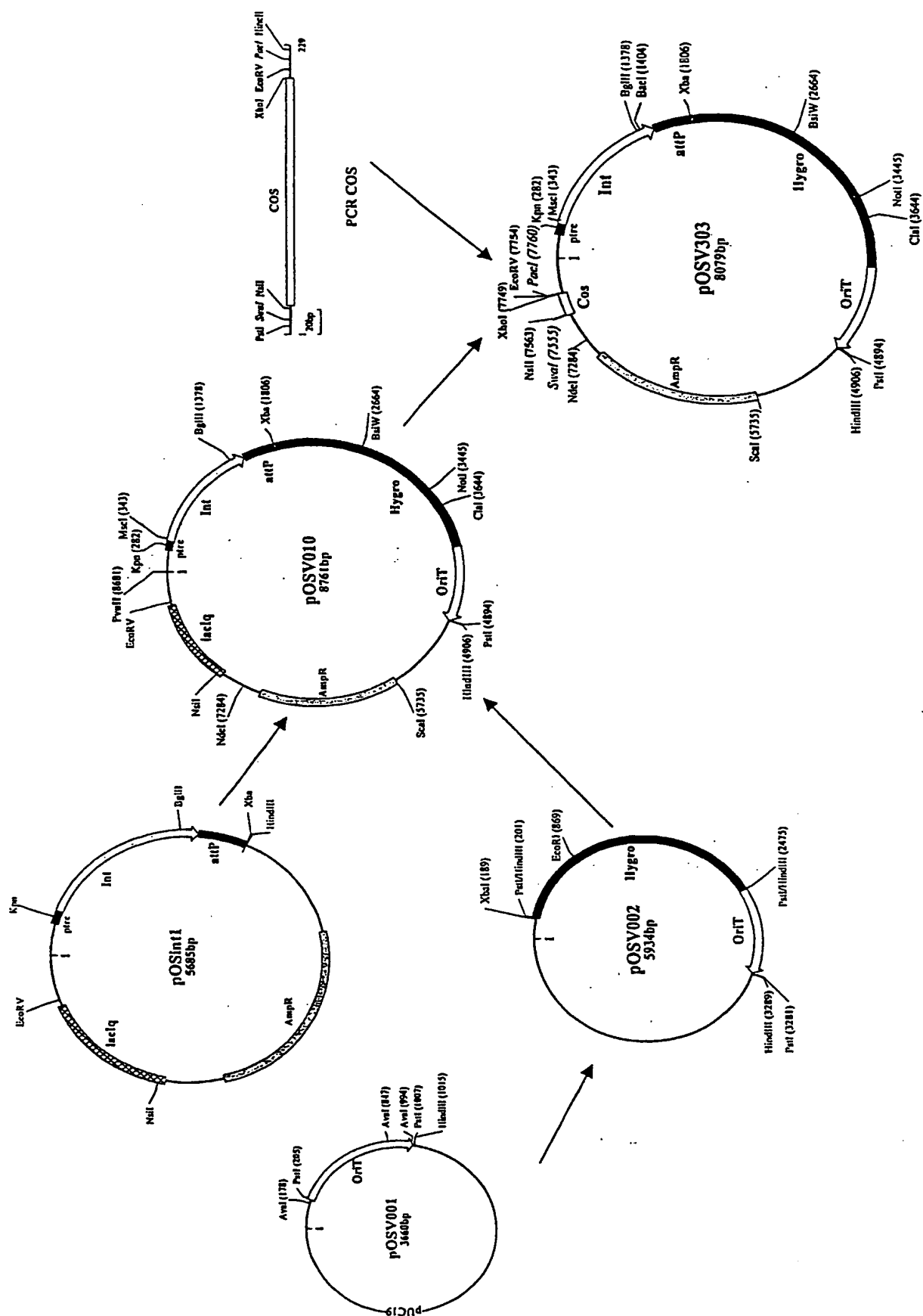


FIGURE 25

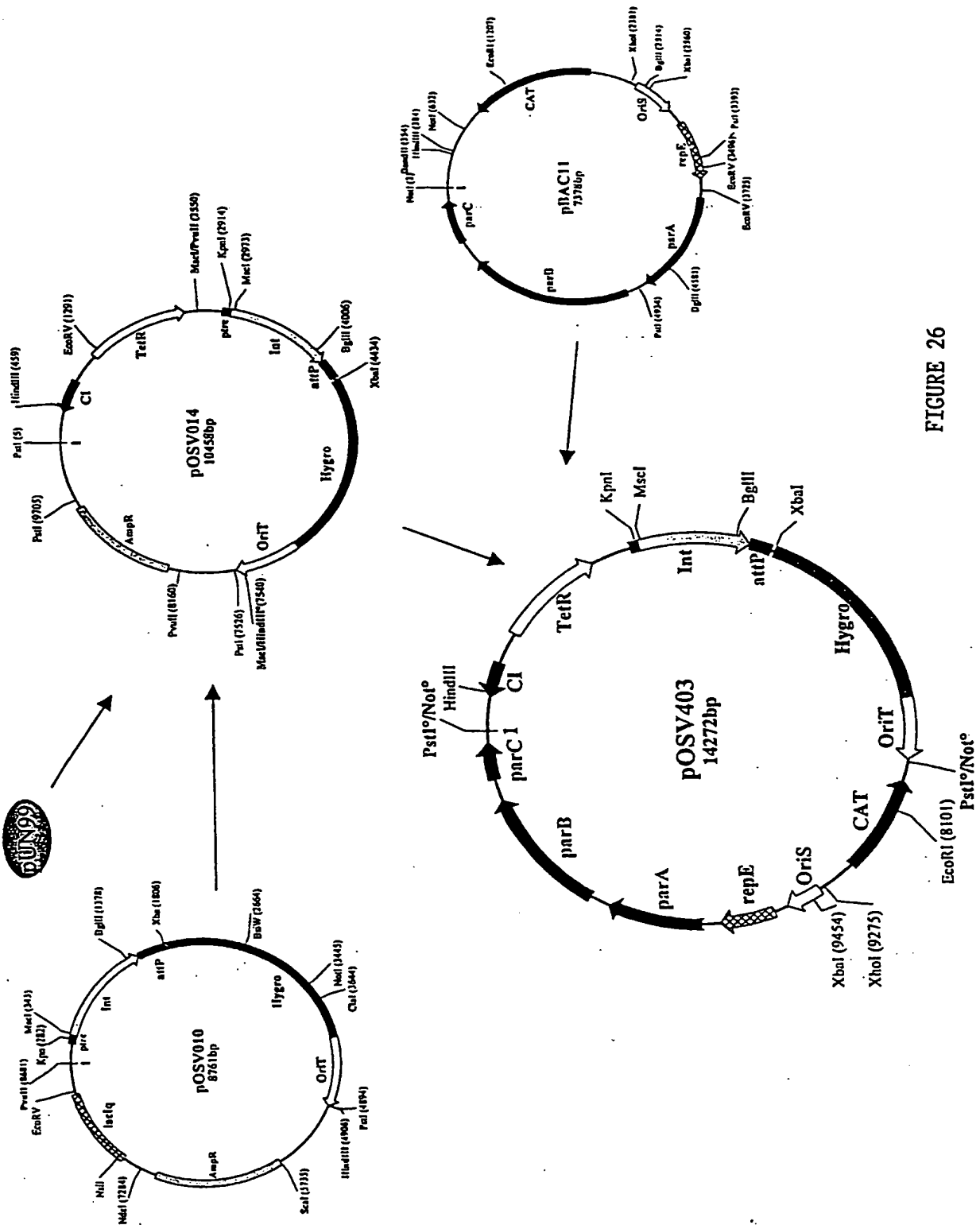


FIGURE 26

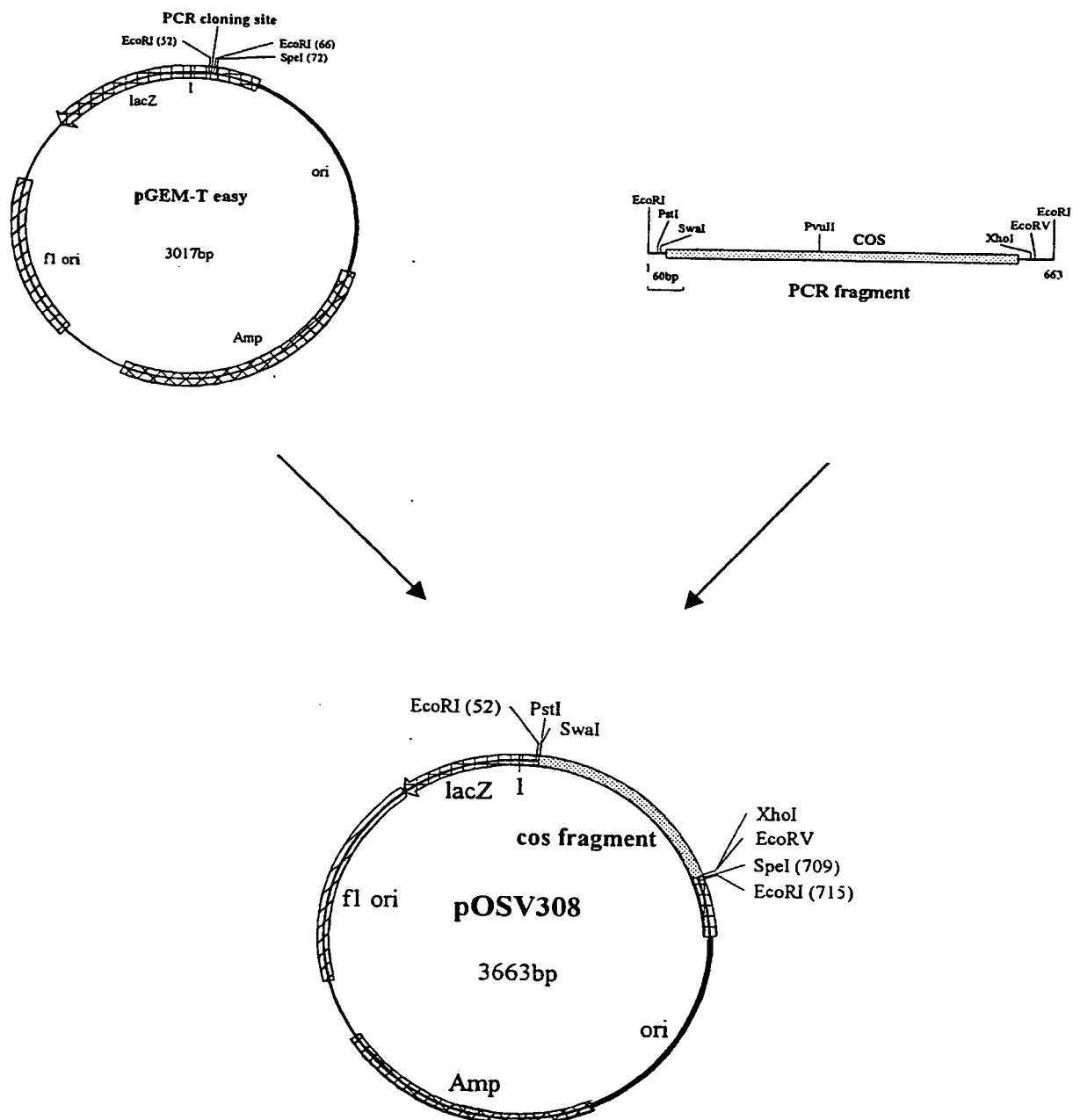


FIGURE 27

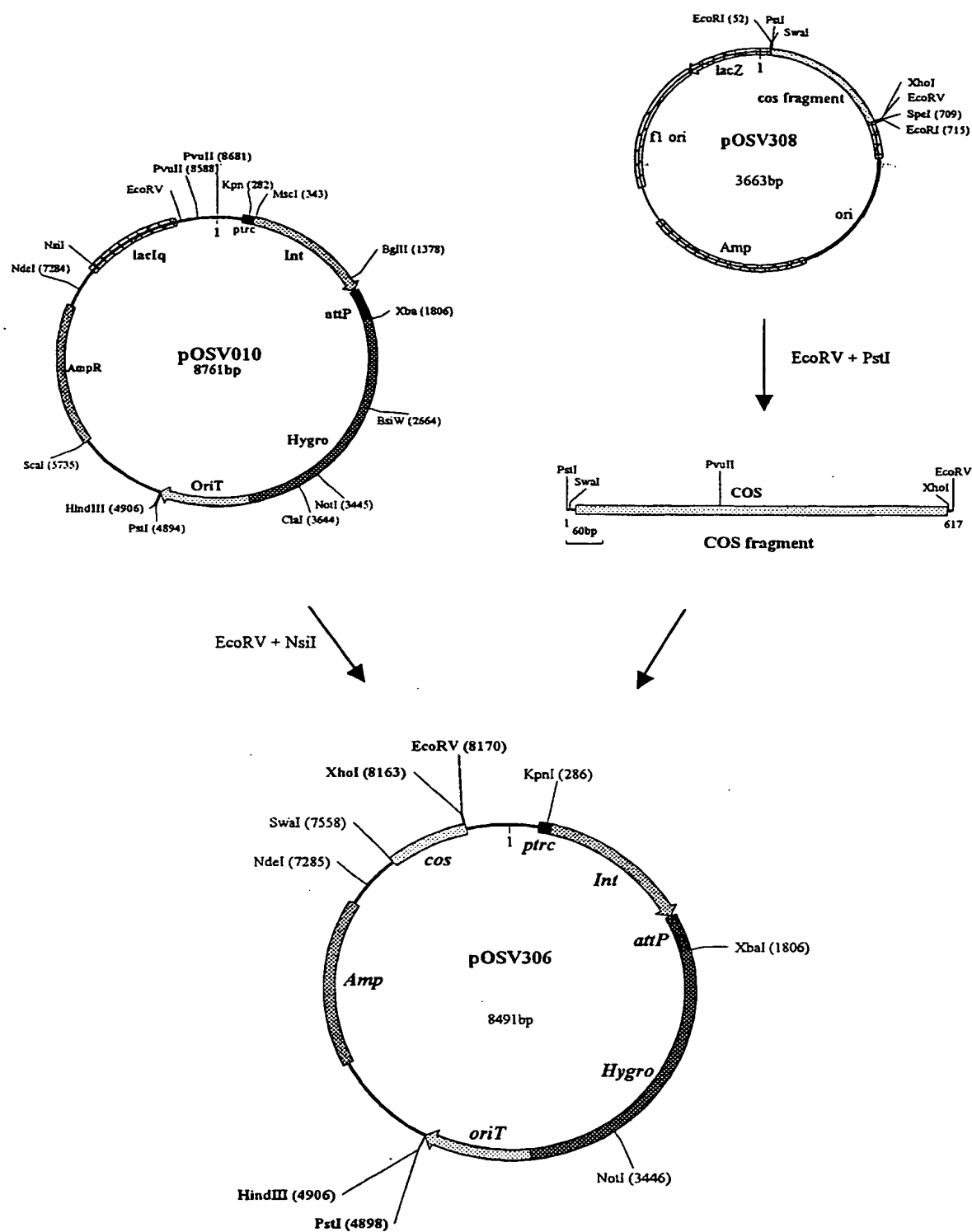


FIGURE 28

30/38

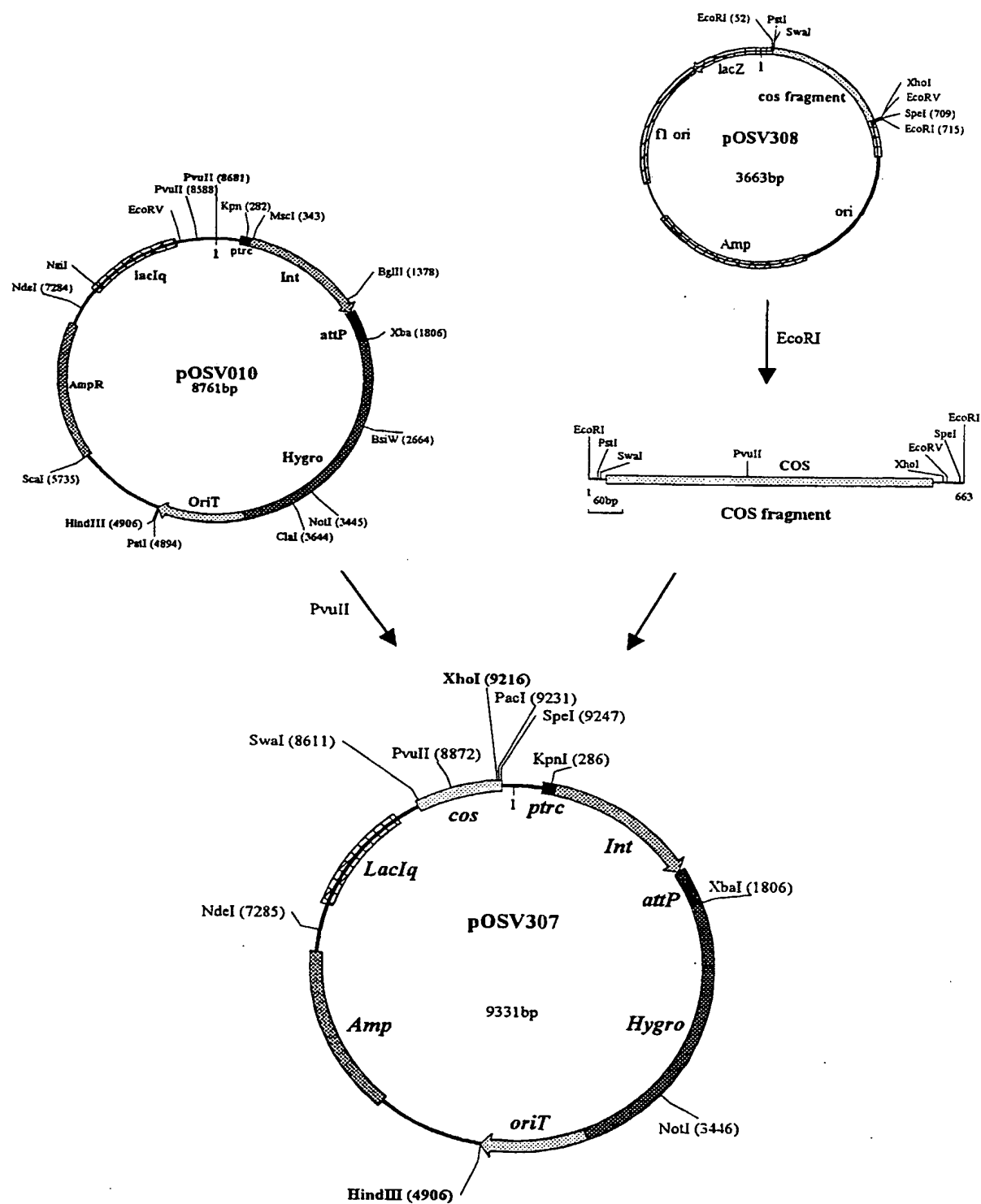


FIGURE 29

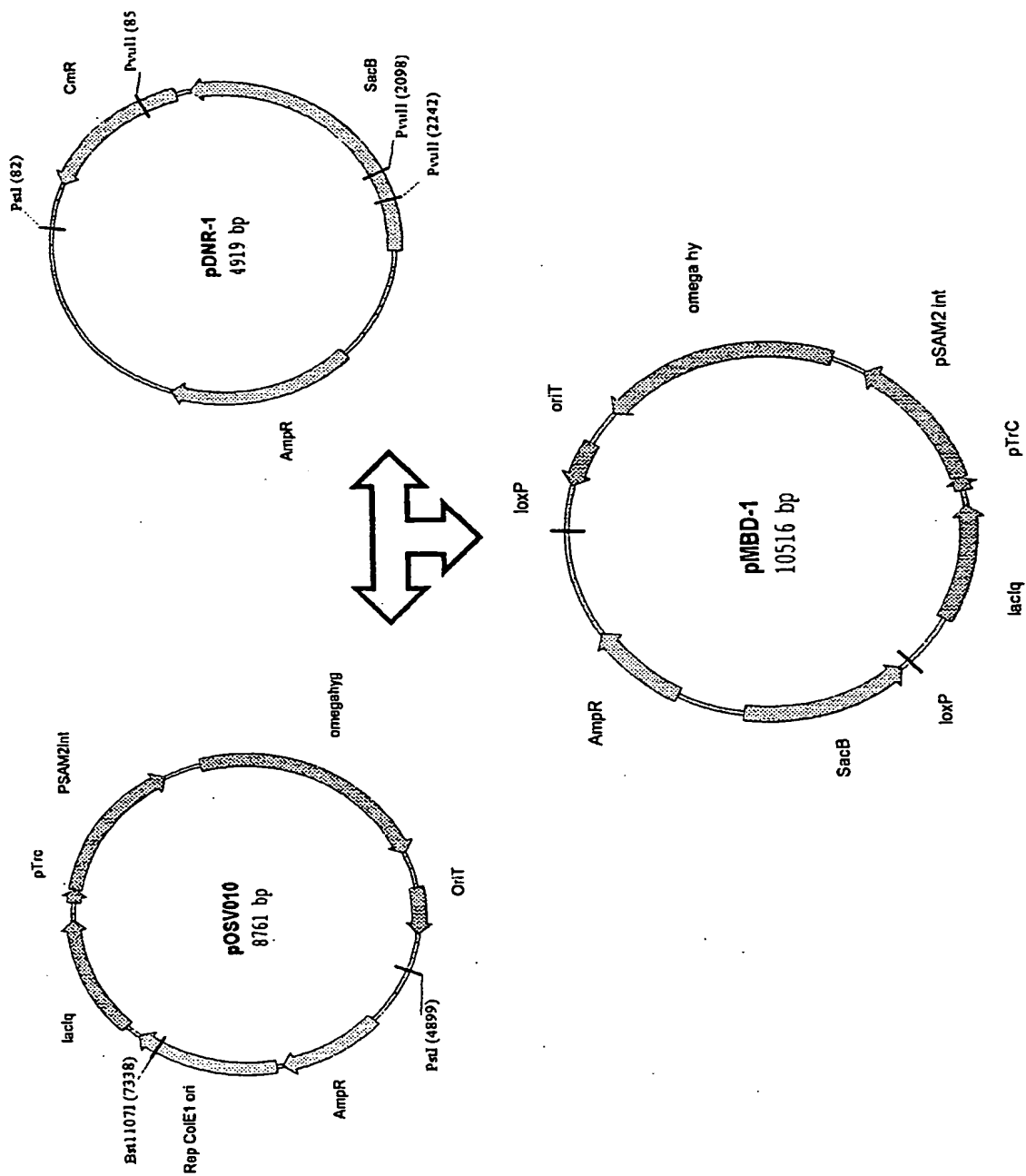


FIGURE 30

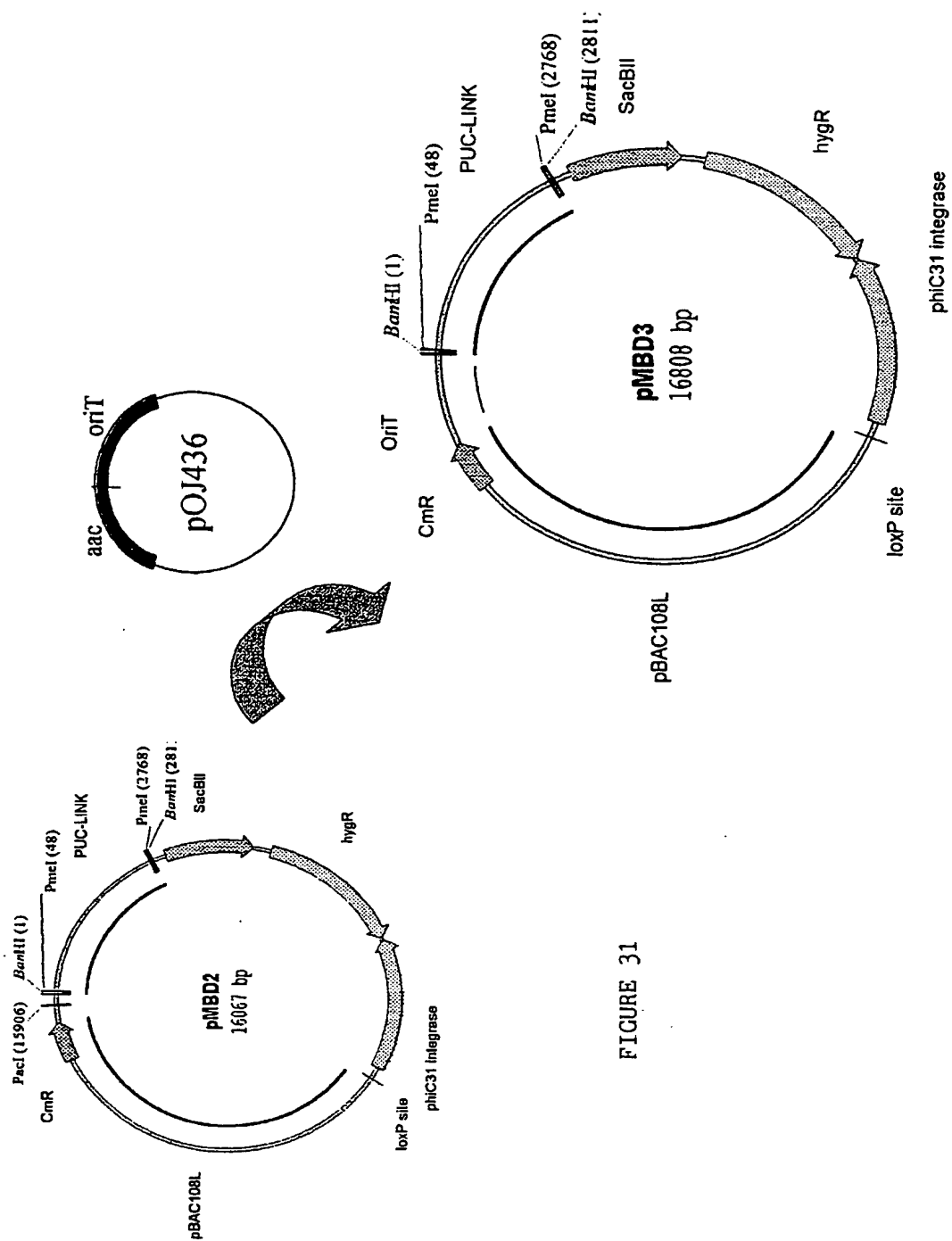


FIGURE 31



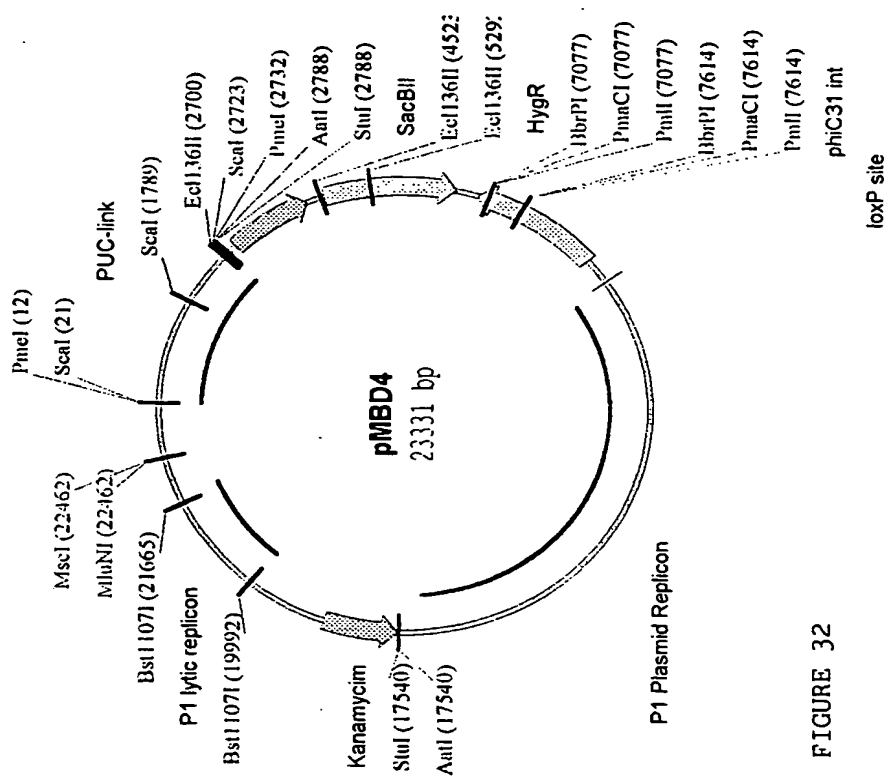


FIGURE 32

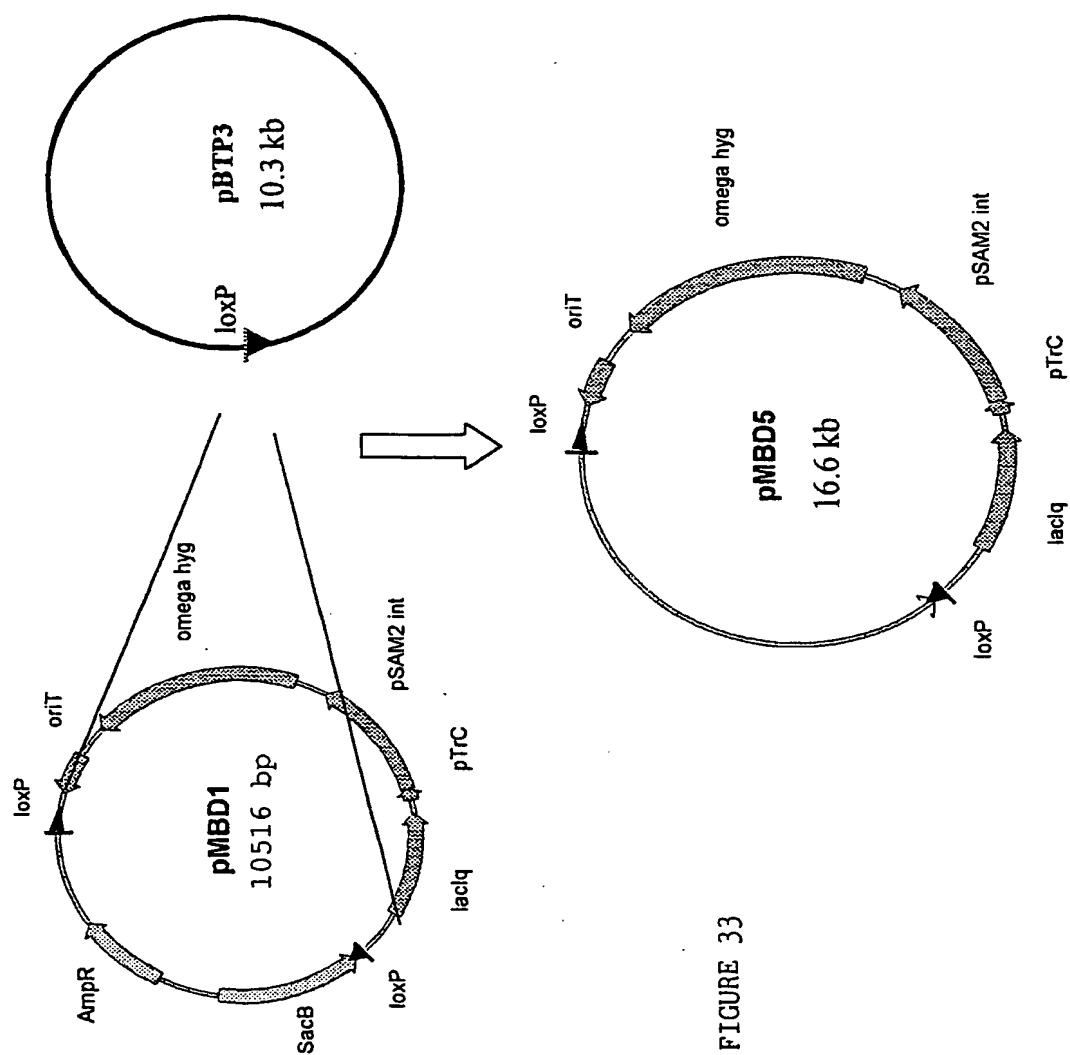


FIGURE 33

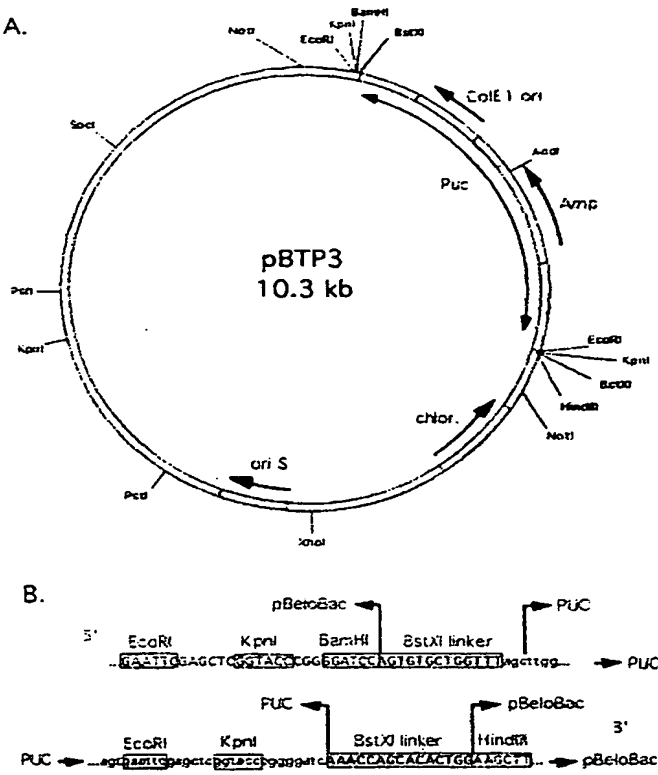


FIGURE 34

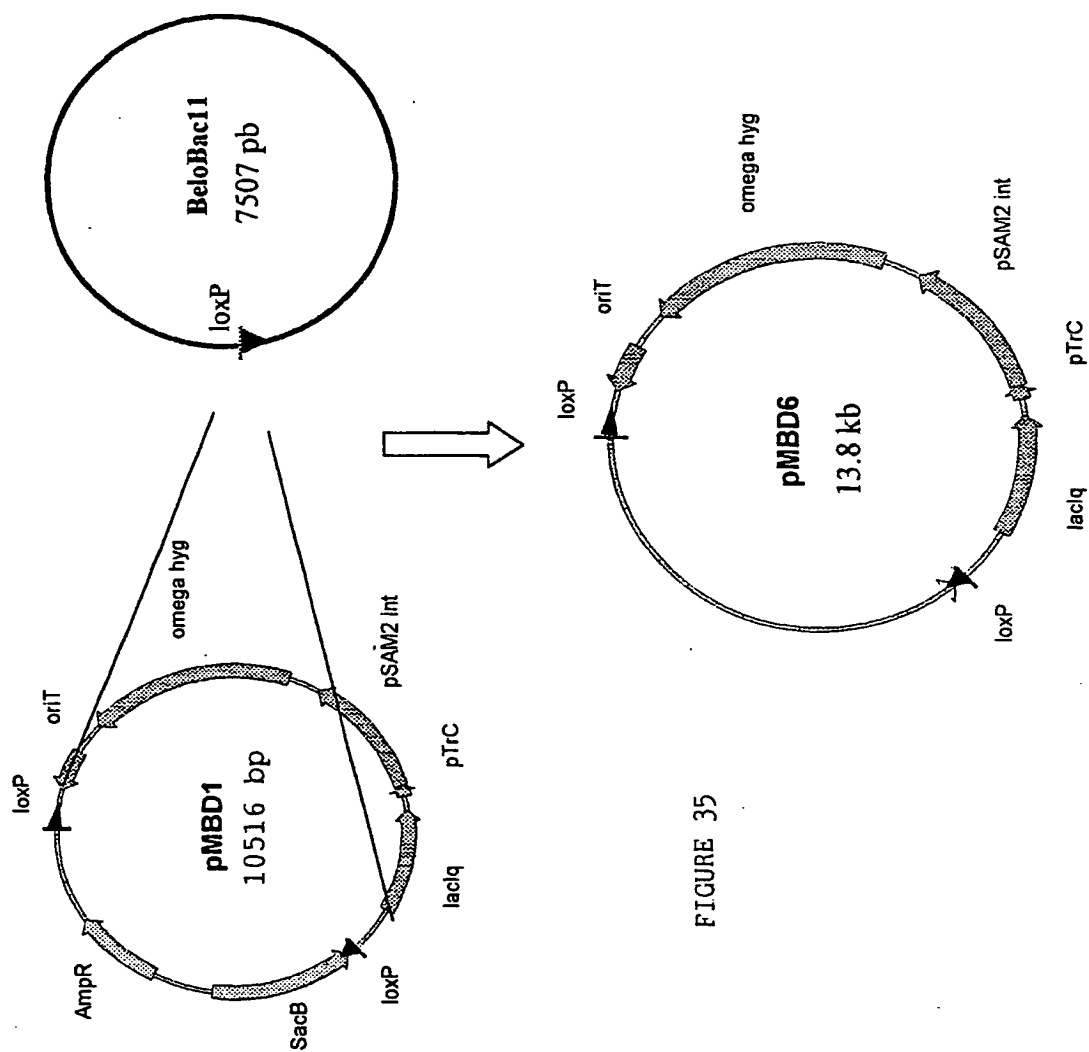


FIGURE 35

37/38

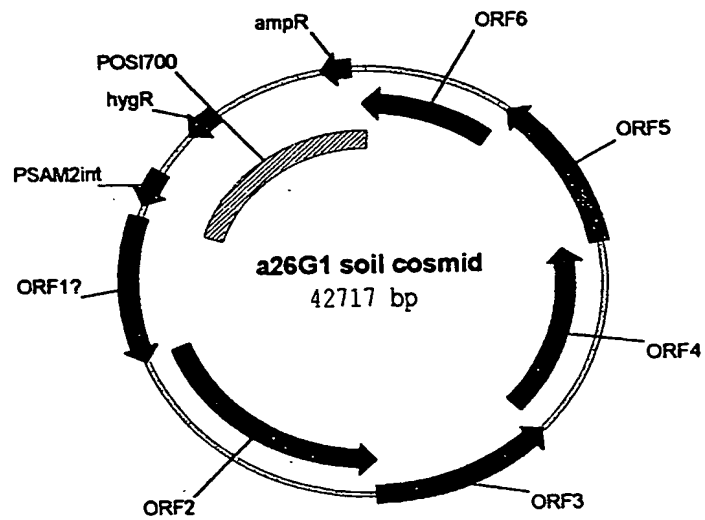


FIGURE 37

38/38

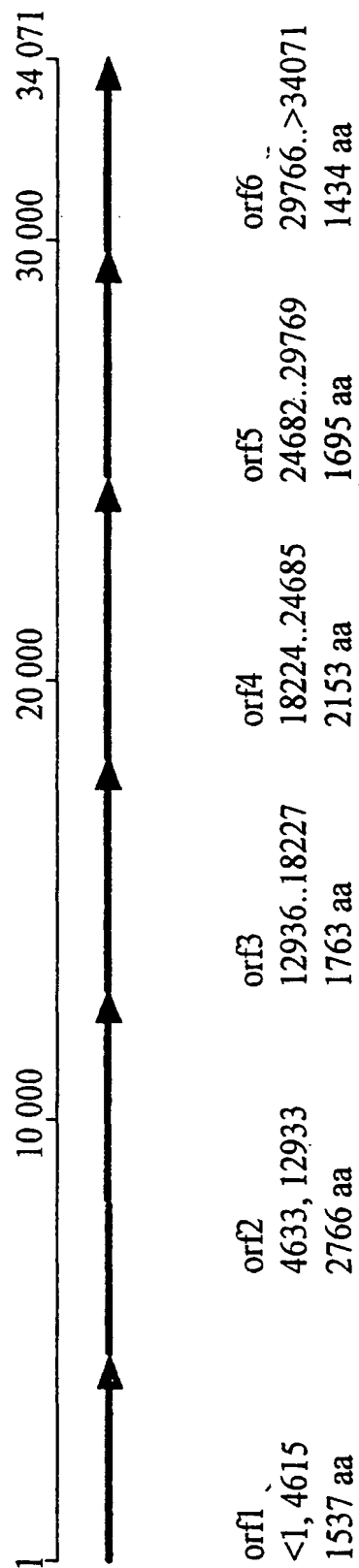


FIGURE 37

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Aventis Pharma S.A.

<120> Procédé d'obtention d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol, acides nucléiques ainsi obtenus et leur application à la synthèse de composés

<130> Banque d'ADN du sol - RPR S.A.

<140>

<141>

<150> FR9915032

<151> 1999-11-29

<160> 126

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:sonde  
FGPS431

<220>

<221> variation

<222> (14)

<223> Base A remplacée par G

<400> 1

acgggcggtg tgtac

15

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
FGPS122

<400> 2

ggagagtttg atcatggctc ag

22

<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
FGPS350

<400> 3  
cctggagtta agccccaagc

20

<210> 4  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:sonde  
FGPS643

<220>  
<221> variation  
<222> (20)  
<223> T remplacée par C

<400> 4  
gtgagtnnna acctgcccct gact

24

<210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:sonde  
FGPS643-2

<400> 5  
gtgagtaacc tgcccccgac t

21

<210> 6  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle



<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
R499

<400> 6

ttaattcact tgcaactgat ggg

23

<210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
R500

<400> 7

aacgatagct cctacatttg gag

23

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:sonde C501

<400> 8

ttgctgatac ggtatagaac ctggc

25

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
FGPS516

<400> 9

tccagatcct tgacccgcag

20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
FGPS517

<400> 10

cacgacattg cactccaccg

20

<210> 11

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:sonde  
FGPS518

<400> 11

ccgtgagccg gatcag

16

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:FGPS612

<220>

<221> variation

<222> (2)

<223> Base C remplacée par T

<220>

<221> variation

<222> (7)

<223> Base T remplacée par C

<220>

<221> variation

<222> (7)

<223> Base T remplacée par A

<400> 12

ccaacttcgt gccagcagcc

20

<210> 13

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS669

<220>  
<221> variation  
<222> (7)  
<223> Base A remplacée par G

<220>  
<221> variation  
<222> (13)  
<223> Base A remplacée par C

<400> 13  
gacgtcatcc ccaccttcct c 21

<210> 14  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS618

<220>  
<221> variation  
<222> (5)  
<223> Base T remplacée par C

<400> 14  
atggttgctg tcagctcg 18

<210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS614

<400> 15  
gtgtagaagt gaaattcgat t 21

<210> 16  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS615

<400> 16  
cggtggatga tgtggatt 18

<210> 17  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS616

<400> 17  
aggttaaaac tcaaataga 18

<210> 18  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS621

<400> 18  
atacgtaggt ggcaagcg 18

<210> 19  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:FGPS617

<400> 19  
gccgggggtca actcggagg 19

<210> 20  
<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:FGPS680

<220>

<221> variation

<222> (11)

<223> Base A remplacée par C

<220>

<221> variation

<222> (11)

<223> Base A remplacée par T

<220>

<221> variation

<222> (13)

<223> Base T remplacée par A

<400> 20

tgagtcccca actccccg

18

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:FGPS619

<400> 21

gcttggggct taactccagg

20

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce 63f

<400> 22

caggcctaac acatgcaagt c

21

<210> 23

<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce  
1387r

<400> 23  
gggcggngtg tacaaggc

18

<210> 24  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:oligo-1

<400> 24  
gcttatttaa atattaagcg gccgcccggg

30

<210> 25  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:oligo-2

<400> 25  
cccgggcggc cgcattaata tttaaata

28

<210> 26  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce al

<400> 26  
ccncagnagc gcntnttnct nga

23

<210> 27  
<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce a2

<400> 27

gtncngtnc cgtgngtntc na

22

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce b1

<400> 28

ccncagnagc gcntnctnct nga

23

<210> 29

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce b2

<400> 29

gtncngtnc cgtgngcctc na

22

<210> 30

<211> 672

<212> ADN

<213> Streptomyces ambofaciens

<400> 30

|            |            |             |            |            |            |     |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| ccccagcagc | acgtgttcct | cgagacggtg  | tgggagacct | tcgaatccgc | cggagtggac | 60  |
| ccgcgcgcgc | tacgcggtcg | ttccgtcggg  | atgttcgtcg | gcaccaacgc | acaggactac | 120 |
| ccggtggtgt | tggccggatc | cgccgacgag  | ggcctggacg | cccacgcggc | caccggtaac | 180 |
| gcggcgccgc | tgctgtccgc | ccgggtctcg  | tacgccttcg | gcctggaagg | gccggcggtc | 240 |
| accgtcgaca | cggcgtgttc | gtcgtcgtcg  | gtggcccttc | acctggccgc | gcaggcgctg | 300 |
| cggcgccggc | agtgcgatct | ggcactcgcc  | ggcgggtgtg | cggagatgtc | caccgaggcg | 360 |
| gcgttcaccg | agttcgcccg | gcagggcggc  | ctggccgacg | acggccgctg | caaggccttc | 420 |
| tcggccgacg | ccgacggcac | gggctggggc  | gagggcgctc | gcgtcctgct | ggtggagcgg | 480 |
| ctggcgagcg | cccgcgcgaa | cgggcaccgc  | gccctcgccg | tggtacgggg | cagcgcggtc | 540 |
| aaccaggacg | gcgcctccaa | cggctctgacg | gcacccaacg | gcccgtccca | gcagcgagtc | 600 |

atccggcagg cactggcgga cgcccggctg tcgcccgcgg aggtcgacgc ggtcgagacc 660  
cacggcaccg gc 672

<210> 31

<211> 665

<212> ADN

<213> Streptomyces ambofaciens

<400> 31

ccccagcagc gcgtgttcct ggaagcgtcc tgggaggcgg tcgagcgggc aggcacgcac 60  
atgcgcaccc tgcgcggtgg acgcaccggc gtcttcgccg gcgtgatgta ccacgactac 120  
ccgtcgggtg tcgaccccca agcgtctgac ggctacctgg gcacggccaa cgccggcagc 180  
gttctctccg gccgcacgc ctacaccttc gggcttcagg gaccggcggc caccgtggac 240  
acggcctgct cctcgccctt ggtggcgctg cacctcgccg ccagggcgct gcccgccggc 300  
gagtgcgaac tcgccctggt cgggtggggtc acggtcatgt ccggcccgat gatgttcgcg 360  
ggcttcggcc tggagacgg ctctgccgcc gacggccgct gcaaggcgtt cgccgccgcc 420  
gccgacggca ccggctgggg cgaggggtgtc ggtgtgctgc tgggtggagcg gctgtcggac 480  
gcccggcgcc acgggcaccg ggtgctggcc gtggtgcgcg gtacgcgggt caaccaggac 540  
ggtgcctccg gcggcctcac cgcccccaac ggacctgcc agcagcgcg catccgtcag 600  
gccctggcga gcgcggcact cgtaccggcc gaggtcgacg cggtcgagac ccacggcacc 660  
gggac 665

<210> 32

<211> 671

<212> ADN

<213> Saccharopolyspora erythraea

<400> 32

ccgcaggagc gcgtgttcct ggaactcgct tgggaagcac ttgataacgc gggcatcgca 60  
ccgcacagcc tcagggacag ccggacgggc gtgttcttcg gagctatgtg gcacggctac 120  
gcgcagttcg cagccggagc cgtcgaccgc atcaccagc acaccgcgac cgggcacgac 180  
ctgagcatca tcccggccag gatcgccctac ttcttgggct tgcgcggccc ggacatgacc 240  
ctgaacaccg cgtgctcatc ggctttgggtg gccatgcacc aggcacgcca aagcatcctg 300  
ctgggcgaat cctcggtcgc cttggtcggc gggatcagct tgttggtcgc gctggacagc 360  
atggtcgcca tgtcgcggtt cggagcgatg gcccgggacg gccggtgcaa ggcattcgac 420  
tctcgcgca acggctacgt gcgcggcgaa ggcggcggtg tcgtggtgct caaaccgctg 480  
tcgcgcgctc tggccgatgg caacccggtc tactgcgtcc tgcgcggcag cgcggtcaac 540  
aacgacggct tcagcaatgg ccttaccgcg ccgagcccgg cggcgagga gcaggtactg 600  
cgcgacgct acgccaacgc cgggggtcgat ccggcacagg tcgactacgt cgagaccac 660  
gggaccggca c 671

<210> 33

<211> 686

<212> ADN

<213> Organime Inconnu

<220>



<223> Origine de la séquence :organisme du sol

<400> 33

```
ccgcaggagc gcggtgttccct cgagtcgtgc tgggaggcgc tggagcatgc tggatacga 60
actgcacgct accccggccg catcgggctg tgggccggcg cgggcttcaa cagctacctc 120
ctgaccaatc tcatgaacaa ccgcgccttt ttagagagcg tgggcatgta ccagatcttt 180
ctgagcaacg acaaggactt catcgccacc cgcacggctt acaagttaaa cctgcgcggt 240
ccggcgatgg ccgtcggcac cgctgttcc acatcgctgg tggcggttca cgaagcttgc 300
caggcgctgc ggctgggcga gtgtgacatg gcaactggccg gtgctgcgtc tgtcagcacg 360
cccctccggg agggctacct ctaccaggaa ggcattgatta tgagccgtga cggcgtctgc 420
cgcccgcttg acgcccagcg cgatggcacg gtgctgggca atggcgtggc ggtcgtggtg 480
ctcaagcggc tggacgaagc gctccgggac ggtgacacgg tctacgccgt gattcgtggc 540
acggcgggtc acaacgacgg ctctgtcaag atcgggttca cggcgcccag cgccgagggg 600
cagagccggg tcgtgcggga cgccctgcgg gcggccgcgg tcccggcgga gagcgtgacc 660
tacgtcgaca cgcacggcac cggcac 686
```

<210> 34

<211> 689

<212> ADN

<213> Organime Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :organisme du sol

<400> 34

```
ccccagcagc gcctgttccct cgagtgcgcg tgggaagcga tggagaacgc gggatatgcg 60
gcgcgaagct ataagggttc gatcggcggt ttcgcgggat gcggcgtcaa tacctacctg 120
ctgaacaacc tcgccaccgc ggagccgttc gatttctcac gccctccgc gtaccagctg 180
ctgacggcca acgacaagga tttcctggcc acgcgtgtct cttacaagct gaacctccgc 240
gggcccagcc tgacggttca gacggcgtgc tccacctcgc tgggtgctcgg ggtgatggca 300
tgcgagagct tgcagcgcgg cgctcggac attgccttgg ccgggggagt tgccatcaat 360
ttccgcagt ccgtggggta cctgcaccag ccgggcatga tctgtcgc ccgacgggcgc 420
tgccgcgcct tcgatgagtc cgctcaaggc acgggtgccg gcaacggcgc ggggtgtggc 480
gtcctcaagc gcttgagccg cgctctggcc gatggcgaca cgatctacgc cgtcattcgc 540
ggagcggcta ttaataatga tggcgccgag cgcattgggt ttaccgctcc aggtgtggac 600
ggtcagacgc gattgattcg gcgcactcaa gagatggcgg gcgtgaagcc ggagtccatc 660
ggctacatgg acaccacgg caccggcac 689
```

<210> 35

<211> 671

<212> ADN

<213> Organime Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :organisme du sol

<400> 35

```
ccgcagcagc gcctcttccct cgaggtggca tgggaagctt tggagcgtgc gggtcggccg 60
```

```

cccgacagtc tcgcgggcag cgacaccgga gtgttcacgc ggatcagcac cgacgactac 120
agccggctga aacctaccga tccggcgctc attgacgcct ataccggtac cggaaccgcg 180
ttcagcactg ccgcccggacg gatctcctat ctgctggggg tgcagggacc gaacttcccc 240
gtcgacacgg cgtgctcttc ctcaactcgtg gcggttcacg tggcgtgccg cagcttgacg 300
tcgcgagagt gcagcatggc gctggccggc ggcgtgaacc tgattctggc gccggaaagc 360
acgatctact tctgccgcct gcggggccatg gcggccgatg gccgttgcaa aagtttcgct 420
gcctccggccg acggttacgg ccgcccgcgag ggatgcggaa tgctgggtgct gaagcggctg 480
tccgatgcga cgcgtgacgg cgatcgtatt ctggcgctga ttcgcggatc ggccgtcaac 540
cacggcgggc gcagcaacgg cctcacggcg ccgaacgggc cggcgcagga agccgtgatt 600
cgggcgggcg tcaagaacgc cggcatggcc cccgccgatg tcgattacgt ggacacccac 660
ggcaccggca c
671

```

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 758

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 36

```

ccgcaggagc gcgtcttcct cgaacgcatt gacggtttcg atgcggaatt cttcggcatc 60
tccccccgcg aagctctgaa catggatccg cagcagcggc tgctgctgga agtgtgctgg 120
gaagcggcag aggacgccgg catctctccc ggccctctgg cgggcagcgc gaccggcgctc 180
tttgccggct cctgcgcca ggacttcgga ctgtttcagt acgccgacc tgcccgcac 240
ggagcttggc cgggttcggc cgtggcgcat agcatgttg ccaatcgcat ctctatctg 300
ctcgacctgc gcggtccgag catggcggtc gatacggcct gtcctccgc gctcgtcgcc 360
gtccatctgg cttgccaaag cctgcgcccg cgcgaatgcg atgcggcatt cgccggcgga 420
gtgaacttga tctgactcc cgagggcatg atcgcttctg cgaaggctcg catgttgggc 480
cccgacggac gctgcaagac gtccgacgcc gcagccgacg gttatgtgcg cggcgagggc 540
tgccggcatc tgctgctgaa gcggctctcc gatgcgctgg ccgatggcga tgccatctgt 600
gcagtcaccc gcggctcggc aatcaatcag gacggacgga gcaatggcat cacggcgccg 660
aatctgcagg cgcagaaggc ggtcctgcaa gaggcggtgg ccaacgcgca catcgatcca 720
tcccacgtat cgttgatcga cacgcacggc accggcac
758

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 704

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 37

```

ccgcagcagc gcgtgttcct cgagtgcgcc tgggaggcgg tggaaagcgc gggctacgat 60
cccgaaaaat atcccgccct gatcggagtt ttccggggg ccagcatcaa cagctatttc 120
ctttataacc tcgcgacaa ccgggaattc gtgcgccgca tggcggggga gtaccaagt 180
ggcgagtacc agacgatcct cggaacgcac aaggactacc tccccactcg cgtctcctac 240

```

```

aaattgaacc tgcgcggccc cagcctggcc gtgcagtcgg cctgctcgac cggcctcgtc 300
gccgtttgtc aggccattca aaatctgcag acttatcagt gcgatatggc cctcgcgggc 360
ggcatctcga tttcgtttcc gcaaaagcgc gactaccgct tcaccgacga aggaatggtc 420
tctcgcgacg gtcactgccg cccgttcgac gccagcgcgc aaggcacggt cttcggcaac 480
ggggccggcg tcgtcctgat gaaaagattg gccgacgcag tgaccgatcg ggacacgatc 540
ctcgcctgta ttagggggcg tgccgtgaac aacgacggcg gcgtcaaaat gggttacacg 600
gcgcccagtg ccgaagggtca ggcgagggcc atcaccctgg ccctcgcgct cgctggcgtc 660
agccccgaga ccatcacttg catggacacc cacggcaccg gcac 704

```

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 680

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 38

```

ccccagcagc gcgtgttcct cgaatgcgcc tgggcgggcg tggagcgccg ccggatatca 60
ggggcagacc ttccacggtg tccatcgggc gtctatgcct caagcggctt taacacctat 120
cttctgaacc tgcattgcaa tgccgcgggtg cgccaatcga tcagcccgtt tgaactgttc 180
gtcgccaacg acaaggattt tctggcgacg cgcacggctt acaagctcaa tctgcgcggc 240
ccggccatga cagtgcagac ggcctgctcc tcctcggttg ttgccgttca tctgcgcggc 300
caaagcctcc tagcggggcg atgcgatatt gcgctcgcgg gcggcatcac ggtttcccgt 360
tcgatggat atgtggcgcg cgaagggtga atattgtctc ctgacgggca ttgccggggc 420
ttcgatgcgg atgccggcgg aaccgttcca ggcagcggcg tcggcggttg cgtgctcaag 480
cgtctcgaag atgcgcttgc agacggcgat acgatcgacg ccgtcatcat cggttcggcc 540
atcaacaatg atggcgcgct gaaggcgagc tttaccgcac cgcagggtga cagccaggcc 600
ttggatcatc gcgaggccca tgcagctgcc ggaatatcgg ccgattccat cggttatatg 660
gacacccacg gcaccgggac 680

```

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 671

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 39

```

ccgcagcagc gcctcttcct cgagctcacc tgggaagcgc tggaagatgc cggcatcccg 60
ccgtccacga ttgccggcac gaatgtcggc gttttcatgg gcgcgtcgca ggctgactac 120
ggccacaagt tcttcagcga ccaagccgct gcggattccc atttcgccac cggcacctcg 180
ctggcggtcg tcgccaatcg catttcctac atctacgacc tgcgcggccc aagcctcact 240
gtagacacgg cgtgctcgtc gtcgctcgtc gcgctgcate aggcgggtga agcgtccgc 300
tcggggcgga tcgaaacagc cattgtcggc ggcattaacg ttatcgccag cccggcgctc 360
ttcatcgctt tctcgcagcg ctcgatgctg tcgccgacgg ggttggtgcca ggctttctcc 420
gccaaaggcc atggctttgt ccgcggcgag ggcggcacgg ttttcgtcct gcgcaaggcg 480

```

```

gcgcatgcmc atggcagccg caaccggtg cgcgggctca ttctcgccac cgacgtcaat 540
tccgacgggc gtaccaacgg catctcgctg ccatcgccg aagcgcagga agtcctcctg 600
caacgcgtct attcacgcgc atcgatcgat ccgaaccgcc tggctttcgt cgacacccac 660
gggaccggga c 671

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 764

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 40

```

ccgcagcagc gcgtgttcct cgacggcatc gaccggttcg atccgcgtca cttegcgata 60
acgccgcgcg aggcgatcag catggacccg cagcagcggc tcttgctcga ggtcacgtgg 120
gaagcgctgg agcgcgccgg cgtggcgccc gatcgctga ccggatccga caccggcgctc 180
ttcatcgcca tcagcaccaa cgactacggc cagatcctgc tgcgcgcctc ggaccagata 240
gatccgggga tgtacttcgg caccggcaac ctggtgaacg cggcggcggg acgcctctcg 300
tacgtcctcg gcctgcaggg tccgagcatg gcggtcgaca ccgcatgtcc gtcgtcgctg 360
gtggcgattc atctcgcgctg tcagagcctg cgcaaccgcg agtgccgcag ggcgctcgcc 420
ggcggcgcca acctggtgct cgtcccggaa gtgacggta actgctgccg cgccaagatg 480
ctcgcgctg acgggcgctg caagacgttc gacgcccgcg cggacggcta cgtccgcggc 540
gaaggggccc cggatgatcg gctgaagcgg ctctccgacg cgctggcgga cggcgatccg 600
atcgtcgcgc tgatccgcgg atccgcggtc aatcaggacg gccgcagcgg cggcttcacc 660
gcgccgaacg aactggcgca gcaggcggtg atccggaccg cgctcgcggc agcgggcgtc 720
gccgcgtccc acatcggtta cgtggacacg cacggcaccg ggac 764

```

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 763

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 41

```

ccgcagcagc gcgtgttcct cgacggcatc gaccggttcg atccgcagtt ttccgggata 60
gcgccgcgcg aagcggccgg catcgatccg cagcagcggc tgctgctcga gacgacgtgg 120
gaagcgctgg aagacgccgg gacgtcgccg gaaaagctgc agggaaaccc ggccggcgctg 180
ttcgtcggca tcaacagcat cgactacgcg acgctgcagc tgcagaactg cgatctggcc 240
agcatcgacg cctattcgct ctccggcagc gcgcacagca tcgcgccggg gcggctcgcc 300
tacgtgctcg gcctgcaggg gccggcgatg gcggtcgaca ccgctgctc gtcgtcgctg 360
gtcgcgatcc acctggcgctg ccagagcctg cgcaacgacg actgccgcgt cgccgtggcc 420
ggcggcgctg acgtcacgct gacgccgatc aacatggtcg tgttctcgaa gctgcgcatg 480
ctggcgcgcg acggcaagtg caagacgttc gacggccgcg gcgacggatt cgtcgaaggc 540
gagggctgcg cggatcatcg cctcaagcgg ttgtcgcacg cgcttgccga caaggatcgg 600
atcctcgcgc tgggtgcgcgg ttccggcggtc aaccaggacg gcgcgagcag cggctctacc 660

```

gcgccgaacg gtccggcgca ggaagcggtc atccgcgcgg cgttgaagcg ggccggcgctg 720  
 cagccggcgg aggtcggcta cgtggacacc cacggcaccg gca 763

<210> 42

<211> 668

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :organisme du sol

<400> 42

ccgcaggagc gcgtgctgct ggaatcctcg tggcatgcgc tggaaagacgc cggctatgcc 60  
 qgcgaaagca tcgccggcgc gcgctgcggc gtgtacatgg gcttcaacgg cggcgactac 120  
 jcgacctgc tgtacggcca gccgtcgctg ccgccgcacg cgatgtgggg caacgccgcc 180  
 tcggtgctgt cggcgcgcat cgcctattac ctggacctgc aaggcccggc gatcaccctc 240  
 gacaccgcct gttcgagctc gttggtcgcg gtgcatctgg cctgccaggg gctgtggacc 300  
 ggcgagaccg atctggccct ggccggcggc gtgtggatcc agtgcacgcc cggattcctg 360  
 atctctcca gccgcgccgg catgctctcg ccgaccggcc agtgcgcgcg gttcggcgcc 420  
 ggcgccgacg gcttcgtgcc gtccgaaggc gtccggcgtg tctgtctcaa gcgcctgcag 480  
 gacgcgctcg acgccggcga ccacatntac ggcgatgcc gcggcagcgc gatcaaccag 540  
 gacggcgcca gcaacggcat caccgcgccg agcgccgccg cccaggagcg cttgcagcgc 600  
 cacgtctacg acagcttcgg catcgacgcc tcgcgcctgc agatgatcga ggcccacggc 660  
 accggcac 668

<210> 43

<211> 671

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :organisme du sol

<400> 43

ccgcaggagc gcgtgctgct ggaggtgact tgggaggcac tcgaagacgc cggccaagac 60  
 gtggaccgct tggccgggcg gcccgtcggc gtcttcgctc ggatctcgtc gaacgattac 120  
 ggccagcttc agaacggcga cccggccgac gtggacgcct acgtcggcac cggtaacgcg 180  
 ctgagcatcg ccgccaaccg actcagctac acgtttgact ttcgcggccc gagtctggcg 240  
 gtggacacgg cgtgctcgtc ttcactcgtc gcgatccatc tcgcctgccg gagcgttcgc 300  
 cgcggtgaag cggaaactcg cgtcgcggcc ggcgtaact tgattctgac ccccggcctg 360  
 acggtgaatt tcacccgcgc cggcatgatg gcgcctgacg gccggtgcaa gacgttcgac 420  
 gcggccgcca acggctacgt gcgcggcgaa ggccggcgcg tcgtcgtgct caagccgctg 480  
 gccagggcta tcgccgacgg cgaccggatc tacgcgatcg tccgtggcag cggcgtaac 540  
 caggacggcc gttccaacgg cctcaccgcc ccgaaccgac aggcccaaga ggtcgtgctg 600  
 cgggcccgcgt atcgtgacgc gggcatcagc ccggccgatg tcgacgccgt cgaggccac 660  
 ggcaccggca c 671

<210> 44  
 <211> 707  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 44  
 ccccgagcagc gcgtgttcct cgaggacgcg actgaggtcg acgtggatgc gcttttcagac 60  
 ggcgaaagacg tcgtgatcgc cggcatcatg cagcacatcg aggaggccgg catccactcg 120  
 ggcgattcat cgtgcgtgct tccgccggtc gacatcccgc cgaaggcgct gcagacgatc 180  
 cgcgatcaca cgttcaagct cgcgcgcgcg ttgaaggta tggcctgat gaacgtgcag 240  
 tacgcgattc agcgcgacaa ggtctacgtg attgaggtaa accctagggc ttctcgaact 300  
 gtcccgtatg tctcgaaggc gacaggcgtg ccgctggcga aggtcgcgtc acgcttgatg 360  
 accggacgca aactgcacga gctgttgccg gaaggggtcg agcgcggctg gatcaccacc 420  
 gcgggcgaga atttctacgt gaagtcgccg gtcttcccgt ggggtaagtt cccgggcgtt 480  
 gacactgtgc tcgggcccga gatgaaatcg accggcgaa tcatgggcgt cgccgacaac 540  
 ttcggcgagg ccttcgcca ggcacagatc gccgccggca catacctgcc gaccgaaggt 600  
 accgtcttca tctcgggtcaa cgaccgtgac aaaggcaacg tcattcagct ggcgagcgt 660  
 ttctccgaac tcgggttcgg cattgtcgac acgcacggca ccgggac 707

<210> 45  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces ambofaciens

<400> 45  
 Pro Gln Gln His Val Phe Leu Glu Thr Val Trp Glu Thr Phe Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Val Asp Pro Arg Ala Val Arg Gly Arg Ser Val Gly Met Phe  
 20 25 30  
 Val Gly Thr Asn Gly Gln Asp Tyr Pro Val Val Leu Ala Gly Ser Ala  
 35 40 45  
 Asp Glu Gly Leu Asp Ala His Ala Ala Thr Gly Asn Ala Ala Ala Val  
 50 55 60  
 Leu Ser Gly Arg Val Ser Tyr Ala Phe Gly Leu Glu Gly Pro Ala Val  
 65 70 75 80  
 Thr Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Leu His Leu Ala  
 85 90 95  
 Ala Gln Ala Leu Arg Arg Gly Glu Cys Asp Leu Ala Leu Ala Gly Gly  
 100 105 110

Val Ser Glu Met Ser Thr Glu Ala Ala Phe Thr Glu Phe Ala Arg Gln  
 115 120 125  
 Gly Gly Leu Ala Asp Asp Gly Arg Cys Lys Ala Phe Ser Ala Asp Ala  
 130 135 140  
 Asp Gly Thr Gly Trp Gly Glu Gly Val Gly Val Leu Leu Val Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Asp Ala Arg Arg Asn Gly His Arg Ala Leu Ala Leu Val Arg  
 165 170 175  
 Gly Ser Ala Val Asn Gln Asp Gly Ala Ser Asn Gly Leu Thr Ala Pro  
 180 185 190  
 Asn Gly Pro Ser Gln Gln Arg Val Ile Arg Gln Ala Leu Ala Asp Ala  
 195 200 205  
 Arg Leu Ser Pro Ser Glu Val Asp Ala Val Glu Thr His Gly Thr Gly  
 210 215 220  
 Thr  
 225

<210> 46  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces ambofaciens

<400> 46  
 Ala Ser Trp Glu Ala Val Glu Arg Ala Gly Ile Asp Met Arg Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Gly Arg Thr Gly Val Phe Ala Gly Val Met Tyr His Asp Tyr  
 20 25 30  
 Pro Ser Val Val Asp Pro Glu Ala Leu Asp Gly Tyr Leu Gly Thr Ala  
 35 40 45  
 Asn Ala Gly Ser Val Leu Ser Gly Arg Ile Ala Tyr Thr Phe Gly Leu  
 50 55 60  
 Gln Gly Pro Ala Val Thr Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 Ala Leu His Leu Ala Ala Gln Ala Leu Pro Ala Gly Glu Cys Glu Leu  
 85 90 95

Ala Leu Val Gly Gly Val Thr Val Met Ser Gly Pro Met Met Phe Ala  
100 105 110

Gly Phe Gly Leu Glu Asp Gly Ser Ala Ala Asp Gly Arg Cys Lys Ala  
115 120 125

Phe Ala Ala Ala Ala Asp Gly Thr Gly Trp Gly Glu Gly Val Gly Val  
130 135 140

Leu Leu Val Glu Arg Leu Ser Asp Ala Arg Arg His Gly His Arg Val  
145 150 155 160

Leu Ala Val Val Arg Gly Ser Ala Val Asn Gln Asp Gly Ala Ser Gly  
165 170 175

Gly Leu Thr Ala Pro Asn Gly Pro Ala Gln Gln Arg Val Ile Arg Gln  
180 185 190

Ala Leu Ala Ser Ala Ala Leu Val Pro Ala Glu Val Asp Ala Val  
195 200 205

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 223

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Saccharopolyspora erythraea

&lt;400&gt; 47

Pro Gln Glu Arg Val Phe Leu Glu Leu Ala Trp Glu Ala Leu Asp Asn  
1 5 10 15

Ala Gly Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Asp Ser Arg Thr Gly Val Phe  
20 25 30

Phe Gly Ala Met Trp His Gly Tyr Ala Gln Phe Ala Ala Gly Ala Val  
35 40 45

Asp Arg Ile Thr Gln His Thr Ala Thr Gly His Asp Leu Ser Ile Ile  
50 55 60

Pro Ala Arg Ile Ala Tyr Phe Leu Gly Leu Arg Gly Pro Asp Met Thr  
65 70 75 80

Leu Asn Thr Ala Cys Ser Ser Ala Leu Val Ala Met His Gln Ala Arg  
85 90 95

Gln Ser Ile Leu Leu Gly Glu Ser Ser Val Ala Leu Val Gly Gly Ile  
100 105 110



Ser Leu Leu Val Ala Leu Asp Ser Met Val Ala Met Ser Arg Phe Gly  
 115 120 125

Ala Met Ala Pro Asp Gly Arg Cys Lys Ala Phe Asp Ser Arg Ala Asn  
 130 135 140

Gly Tyr Val Arg Gly Glu Gly Gly Gly Val Val Val Leu Lys Pro Leu  
 145 150 155 160

Ser Arg Ala Leu Ala Asp Gly Asn Pro Val Tyr Cys Val Leu Arg Gly  
 165 170 175

Ser Ala Val Asn Asn Asp Gly Phe Ser Asn Gly Leu Thr Ala Pro Ser  
 180 185 190

Pro Ala Ala Gln Glu Gln Val Leu Arg Asp Ala Tyr Ala Asn Ala Gly  
 195 200 205

Val Asp Pro Ala Gln Val Asp Tyr Val Glu Thr His Gly Thr Gly  
 210 215 220

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 211

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :organisme du sol

&lt;400&gt; 48

Ser Cys Trp Glu Ala Leu Glu His Ala Gly Tyr Asp Thr Ala Arg Tyr  
 1 5 10 15

Pro Gly Arg Ile Gly Leu Trp Ala Gly Ala Gly Phe Asn Ser Tyr Leu  
 20 25 30

Leu Thr Asn Leu Met Asn Asn Arg Ala Phe Leu Glu Ser Val Gly Met  
 35 40 45

Tyr Gln Ile Phe Leu Ser Asn Asp Lys Asp Phe Ile Ala Thr Arg Thr  
 50 55 60

Ala Tyr Lys Leu Asn Leu Arg Gly Pro Ala Met Ala Val Gly Thr Ala  
 65 70 75 80

Cys Ser Thr Ser Leu Val Ala Val His Glu Ala Cys Gln Ala Leu Arg  
 85 90 95

Leu Gly Glu Cys Asp Met Ala Leu Ala Gly Ala Ala Ser Val Ser Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Pro Leu Arg Glu Gly Tyr Leu Tyr Gln Glu Gly Met Ile Met Ser Arg  
                   115                                  120                                  125  
 Asp Gly Val Cys Arg Pro Phe Asp Ala Asp Ala Asp Gly Thr Val Leu  
                   130                                  135                                  140  
 Gly Asn Gly Val Ala Val Val Val Leu Lys Arg Leu Asp Glu Ala Leu  
                   145                                  150                                  155                                  160  
 Arg Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Val Ile Arg Gly Thr Ala Val Asn  
                                   165                                  170                                  175  
 Asn Asp Gly Ser Val Lys Ile Gly Phe Thr Ala Pro Ser Ala Glu Gly  
                                   180                                  185                                  190  
 Gln Ser Arg Val Val Arg Asp Ala Leu Arg Ala Ala Ala Val Pro Ala  
                   195                                  200                                  205  
 Glu Ser Val  
                   210

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 229

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence : organisme du sol

&lt;400&gt; 49

Pro Gln Gln Arg Leu Phe Leu Glu Cys Ala Trp Glu Ala Met Glu Asn  
           1                                  5                                  10                                  15  
 Ala Gly Tyr Ala Ala Arg Ser Tyr Lys Gly Ser Ile Gly Val Phe Ala  
                   20                                  25                                  30  
 Gly Cys Gly Val Asn Thr Tyr Leu Leu Asn Asn Leu Ala Thr Ala Glu  
                   35                                  40                                  45  
 Pro Phe Asp Phe Ser Arg Pro Ser Ala Tyr Gln Leu Leu Thr Ala Asn  
                   50                                  55                                  60  
 Asp Lys Asp Phe Leu Ala Thr Arg Val Ser Tyr Lys Leu Asn Leu Arg  
                   65                                  70                                  75                                  80

Gly Pro Ser Leu Thr Val Gln Thr Ala Cys Ser Thr Ser Leu Val Ser  
                     85                    90                    95  
 Val Val Met Ala Cys Glu Ser Leu Gln Arg Gly Ala Ser Asp Ile Ala  
                     100                    105                    110  
 Leu Ala Gly Gly Val Ala Ile Asn Val Pro Gln Ser Val Gly Tyr Leu  
                     115                    120                    125  
 His Gln Pro Gly Met Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg Cys Arg Ala Phe  
                     130                    135                    140  
 Asp Glu Ser Ala Gln Gly Thr Val Pro Gly Asn Gly Ala Gly Val Val  
                     145                    150                    155                    160  
 Val Leu Lys Arg Leu Ser Arg Ala Leu Ala Asp Gly Asp Thr Ile Tyr  
                     165                    170                    175  
 Ala Val Ile Arg Gly Ala Ala Ile Asn Asn Asp Gly Ala Glu Arg Met  
                     180                    185                    190  
 Gly Phe Thr Ala Pro Gly Val Asp Gly Gln Thr Arg Leu Ile Arg Arg  
                     195                    200                    205  
 Thr Gln Glu Met Ala Gly Val Lys Pro Glu Ser Ile Gly Tyr Met Asp  
                     210                    215                    220  
 Thr His Gly Thr Gly  
 225

210> 50

<211> 223

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 50

Pro Gln Gln Arg Leu Phe Leu Glu Val Ala Trp Glu Ala Leu Glu Arg  
   1                    5                    10                    15  
 Ala Gly Arg Pro Pro Asp Ser Leu Ala Gly Ser Asp Thr Gly Val Phe  
                     20                    25                    30  
 Ile Gly Ile Ser Thr Asp Asp Tyr Ser Arg Leu Lys Pro Thr Asp Pro  
                     35                    40                    45

Ala Leu Ile Asp Ala Tyr Thr Gly Thr Gly Thr Ala Phe Ser Thr Ala  
 50 55 60

Ala Gly Arg Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Gln Gly Pro Asn Phe Pro  
 65 70 75 80

Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Val His Leu Ala Cys  
 85 90 95

Arg Ser Leu Gln Ser Arg Glu Cys Ser Met Ala Leu Ala Gly Gly Val  
 100 105 110

Asn Leu Ile Leu Ala Pro Glu Ser Thr Ile Tyr Phe Cys Arg Leu Arg  
 115 120 125

Ala Met Ala Ala Asp Gly Arg Cys Lys Ser Phe Ala Ala Ser Ala Asp  
 130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Gly Glu Gly Cys Gly Met Leu Val Leu Lys Arg Leu  
 145 150 155 160

Ser Asp Ala Thr Arg Asp Gly Asp Arg Ile Leu Ala Leu Ile Arg Gly  
 165 170 175

Ser Ala Val Asn His Gly Gly Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ala Pro Asn  
 180 185 190

Gly Pro Ala Gln Glu Ala Val Ile Arg Ala Ala Leu Lys Asn Ala Gly  
 195 200 205

Met Ala Pro Ala Asp Val Asp Tyr Val Asp Thr His Gly Thr Gly  
 210 215 220

<210> 51

<211> 252

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 51

Pro Gln Glu Arg Val Phe Leu Glu Arg Ile Asp Gly Phe Asp Ala Glu  
 1 5 10 15

Phe Phe Gly Ile Ser Pro Arg Glu Ala Leu Asn Met Asp Pro Gln Gln  
 20 25 30

Arg Leu Leu Leu Glu Val Cys Trp Glu Ala Ala Glu Asp Ala Gly Ile  
35 40 45

Ser Pro Gly Pro Leu Ala Gly Ser Ala Thr Gly Val Phe Ala Gly Ser  
50 55 60

Cys Ala Gln Asp Phe Gly Leu Phe Gln Tyr Ala Asp Pro Ala Arg Ile  
65 70 75 80

Gly Ala Trp Ser Gly Ser Gly Val Ala His Ser Met Leu Ala Asn Arg  
85 90 95

Ile Ser Tyr Leu Leu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Met Ala Val Asp Thr  
100 105 110

Ala Cys Ser Ser Ala Leu Val Ala Val His Leu Ala Cys Gln Ser Leu  
115 120 125

Arg Arg Arg Glu Cys Asp Ala Ala Phe Ala Gly Gly Val Asn Leu Ile  
130 135 140

Leu Thr Pro Glu Gly Met Ile Ala Leu Ser Lys Ala Arg Met Leu Ala  
145 150 155 160

Pro Asp Gly Arg Cys Lys Thr Phe Asp Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val  
165 170 175

Arg Gly Glu Gly Cys Gly Ile Val Leu Leu Lys Arg Leu Ser Asp Ala  
180 185 190

Leu Ala Asp Gly Asp Ala Ile Cys Ala Val Ile Arg Gly Ser Ala Ile  
195 200 205

Asn Gln Asp Gly Arg Ser Asn Gly Ile Thr Ala Pro Asn Leu Gln Ala  
210 215 220

Gln Lys Ala Val Leu Gln Glu Ala Val Ala Asn Ala His Ile Asp Pro  
225 230 235 240

Ser His Val Ser Leu Ile Asp Thr His Gly Thr Gly  
245 250

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 52

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gln | Gln | Arg | Val | Phe | Leu | Glu | Cys | Ala | Trp | Glu | Ala | Val | Glu | Ser | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ala | Gly | Tyr | Asp | Pro | Glu | Lys | Tyr | Pro | Gly | Leu | Ile | Gly | Val | Phe | Ala | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Ala | Ser | Ile | Asn | Ser | Tyr | Phe | Leu | Tyr | Asn | Leu | Ala | His | Asn | Arg | 35  | 40  | 45  |     |
| Glu | Phe | Val | Ala | Arg | Met | Ala | Gly | Glu | Tyr | Gln | Val | Gly | Glu | Tyr | Gln | 50  | 55  | 60  |     |
| Thr | Ile | Leu | Gly | Asn | Asp | Lys | Asp | Tyr | Leu | Pro | Thr | Arg | Val | Ser | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Lys | Leu | Asn | Leu | Arg | Gly | Pro | Ser | Leu | Ala | Val | Gln | Ser | Ala | Cys | Ser | 85  | 90  | 95  |     |
| Thr | Gly | Leu | Val | Ala | Val | Cys | Gln | Ala | Ile | Gln | Asn | Leu | Gln | Thr | Tyr | 100 | 105 | 110 |     |
| Gln | Cys | Asp | Met | Ala | Leu | Ala | Gly | Gly | Ile | Ser | Ile | Ser | Phe | Pro | Gln | 115 | 120 | 125 |     |
| Lys | Arg | Asp | Tyr | Arg | Phe | Thr | Asp | Glu | Gly | Met | Val | Ser | Arg | Asp | Gly | 130 | 135 | 140 |     |
| His | Cys | Arg | Pro | Phe | Asp | Ala | Ser | Ala | Gln | Gly | Thr | Val | Phe | Gly | Asn | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Ala | Gly | Val | Val | Leu | Met | Lys | Arg | Leu | Ala | Asp | Ala | Val | Thr | Asp | 165 | 170 | 175 |     |
| Arg | Asp | Thr | Ile | Leu | Ala | Val | Ile | Arg | Gly | Ala | Ala | Val | Asn | Asn | Asp | 180 | 185 | 190 |     |
| Gly | Gly | Val | Lys | Met | Gly | Tyr | Thr | Ala | Pro | Ser | Ala | Glu | Gly | Gln | Ala | 195 | 200 | 205 |     |
| Glu | Ala | Ile | Thr | Leu | Ala | Leu | Ala | Leu | Ala | Gly | Val | Ser | Pro | Glu | Thr | 210 | 215 | 220 |     |
| Ile | Thr | Cys | Met | Asp | Thr | His | Gly | Thr | Gly | 225 | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence : organisme du sol

&lt;400&gt; 53

Pro Gln Gln Arg Val Phe Leu Glu Cys Ala Trp Ala Ala Leu Glu Arg  
 1 5 10 15

Arg Arg Ile Ser Gly Arg His Leu Pro Arg Cys Pro Ser Ala Val Tyr  
 20 25 30

Ala Ser Ser Gly Phe Asn Thr Tyr Leu Leu Asn Leu His Ala Asn Ala  
 35 40 45

Ala Val Arg Gln Ser Ile Ser Pro Phe Glu Leu Phe Val Ala Asn Asp  
 50 55 60

Lys Asp Phe Leu Ala Thr Arg Thr Ala Tyr Lys Leu Asn Leu Arg Gly  
 65 70 75 80

Pro Ala Met Thr Val Gln Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Val  
 85 90 95

His Val Ala Ala Gln Ser Leu Leu Ala Gly Glu Cys Asp Ile Ala Leu  
 100 105 110

Ala Gly Gly Ile Thr Val Ser Arg Ser His Gly Tyr Val Ala Arg Glu  
 115 120 125

Gly Gly Ile Leu Ser Pro Asp Gly His Cys Arg Ala Phe Asp Ala Asp  
 130 135 140

Ala Gly Gly Thr Val Pro Gly Ser Gly Val Gly Val Val Val Leu Lys  
 145 150 155 160

Arg Leu Glu Asp Ala Leu Ala Asp Gly Asp Thr Ile Asp Ala Val Ile  
 165 170 175

Ile Gly Ser Ala Ile Asn Asn Asp Gly Ala Leu Lys Ala Ser Phe Thr  
 180 185 190

Ala Pro Gln Val Asp Ser Gln Ala Leu Val Ile Ser Glu Ala His Ala  
 195 200 205

Ala Ala Gly Ile Ser Ala Asp Ser Ile Gly Tyr Met Asp Thr His Gly  
 210 215 220

Thr Gly  
225

<210> 54  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> Organisme Inconnu

<220>  
<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 54  
Pro Gln Gln Arg Leu Phe Leu Glu Leu Thr Trp Glu Ala Leu Glu Asp  
1 5 10 15  
Ala Gly Ile Pro Pro Ser Thr Ile Ala Gly Thr Asn Val Gly Val Phe  
20 25 30  
Met Gly Ala Ser Gln Ala Asp Tyr Gly His Lys Phe Phe Ser Asp His  
35 40 45  
Ala Val Ala Asp Ser His Phe Ala Thr Gly Thr Ser Leu Ala Val Val  
50 55 60  
Ala Asn Arg Ile Ser Tyr Ile Tyr Asp Leu Arg Gly Pro Ser Leu Thr  
65 70 75 80  
Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Leu His Gln Ala Val  
85 90 95  
Glu Ala Leu Arg Ser Gly Arg Ile Glu Thr Ala Ile Val Gly Gly Ile  
100 105 110  
Asn Val Ile Ala Ser Pro Ala Ser Phe Ile Ala Phe Ser Gln Ala Ser  
115 120 125  
Met Leu Ser Pro Thr Gly Leu Cys Gln Ala Phe Ser Ala Lys Ala Asp  
130 135 140  
Gly Phe Val Arg Gly Glu Gly Gly Thr Val Phe Val Leu Arg Lys Ala  
145 150 155 160  
Ala His Ala His Gly Ser Arg Asn Pro Val Arg Gly Leu Ile Leu Ala  
165 170 175  
Thr Asp Val Asn Ser Asp Gly Arg Thr Asn Gly Ile Ser Leu Pro Ser  
180 185 190



Ala Glu Ala Gln Glu Val Leu Leu Gln Arg Val Tyr Ser Arg Ala Ser  
 195 200 205

Ile Asp Pro Asn Arg Leu Ala Phe Val Asp Thr His Gly Thr Gly  
 210 215 220

<210> 55

<211> 254

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 55

Pro Gln Gln Arg Val Phe Leu Asp Gly Ile Asp Arg Phe Asp Pro Arg  
 1 5 10 15

His Phe Ala Ile Thr Pro Arg Glu Ala Ile Ser Met Asp Pro Gln Gln  
 20 25 30

Arg Leu Leu Leu Glu Val Thr Trp Glu Ala Leu Glu Arg Ala Gly Val  
 35 40 45

Ala Pro Asp Arg Leu Thr Gly Ser Asp Thr Gly Val Phe Ile Gly Ile  
 50 55 60

Ser Thr Asn Asp Tyr Gly Gln Ile Leu Leu Arg Ala Ser Asp Gln Ile  
 65 70 75 80

Asp Pro Gly Met Tyr Phe Gly Thr Gly Asn Leu Leu Asn Ala Ala Ala  
 85 90 95

Gly Arg Leu Ser Tyr Val Leu Gly Leu Gln Gly Pro Ser Met Ala Val  
 100 105 110

Asp Thr Ala Cys Pro Ser Ser Leu Val Ala Ile His Leu Ala Cys Gln  
 115 120 125

Ser Leu Arg Asn Arg Glu Cys Arg Met Ala Leu Ala Gly Gly Ala Asn  
 130 135 140

Leu Val Leu Val Pro Glu Val Thr Val Asn Cys Cys Arg Ala Lys Met  
 145 150 155 160

Leu Ala Pro Asp Gly Arg Cys Lys Thr Phe Asp Ala Ala Ala Asp Gly  
 165 170 175

Tyr Val Arg Gly Glu Gly Ala Ala Val Ile Val Leu Lys Arg Leu Ser  
 180 185 190  
 Asp Ala Leu Ala Asp Gly Asp Pro Ile Val Ala Leu Ile Arg Gly Ser  
 195 200 205  
 Ala Val Asn Gln Asp Gly Arg Ser Gly Gly Phe Thr Ala Pro Asn Glu  
 210 215 220  
 Leu Ala Gln Gln Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Ala Ala Ala Gly Val  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Ser Asp Ile Gly Tyr Val Asp Thr His Gly Thr Gly  
 245 250

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 254

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence : organisme du sol

&lt;400&gt; 56

Pro Gln Gln Arg Val Phe Leu Asp Gly Ile Asp Arg Phe Asp Pro Gln  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Gly Ile Ala Pro Arg Glu Ala Ala Gly Ile Asp Pro Gln Gln  
 20 25 30  
 Arg Leu Leu Leu Glu Thr Thr Trp Glu Ala Leu Glu Asp Ala Gly Thr  
 35 40 45  
 Ser Pro Glu Lys Leu Gln Gly Thr Pro Ala Gly Val Phe Val Gly Ile  
 50 55 60  
 Asn Ser Ile Asp Tyr Ala Thr Leu Gln Leu Gln Asn Cys Asp Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Ile Asp Ala Tyr Ser Leu Ser Gly Ser Ala His Ser Ile Ala Ala  
 85 90 95  
 Gly Arg Leu Ala Tyr Val Leu Gly Leu Gln Gly Pro Ala Met Ala Val  
 100 105 110  
 Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Ile His Leu Ala Cys Gln  
 115 120 125

Ser Leu Arg Asn Asp Asp Cys Arg Val Ala Val Ala Gly Gly Val His  
130 135 140

Val Thr Leu Thr Pro Ile Asn Met Val Val Phe Ser Lys Leu Arg Met  
145 150 155 160

Leu Ala Ala Asp Gly Lys Cys Lys Thr Phe Asp Gly Arg Gly Asp Gly  
165 170 175

Phe Val Glu Gly Glu Gly Cys Ala Val Ile Val Leu Lys Arg Leu Ser  
180 185 190

His Ala Leu Ala Asp Lys Asp Arg Ile Leu Ala Leu Val Arg Gly Ser  
195 200 205

Ala Val Asn Gln Asp Gly Ala Ser Ser Gly Leu Thr Ala Pro Asn Gly  
210 215 220

Pro Ala Gln Glu Ala Val Ile Arg Ala Ala Leu Lys Arg Ala Gly Val  
225 230 235 240

Gln Pro Ala Glu Val Gly Tyr Val Asp Thr His Gly Thr Gly  
245 250

<210> 57

<211> 222

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 57

Pro Gln Glu Arg Val Leu Leu Glu Ser Ser Trp His Ala Leu Glu Asp  
1 5 10 15

Ala Gly Tyr Ala Gly Glu Ser Ile Ala Gly Ala Arg Cys Gly Val Tyr  
20 25 30

Met Gly Phe Asn Gly Gly Asp Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Gly Gln Pro  
35 40 45

Ser Leu Pro Pro His Ala Met Trp Gly Asn Ala Ala Ser Val Leu Ser  
50 55 60

Ala Arg Ile Ala Tyr Tyr Leu Asp Leu Gln Gly Pro Ala Ile Thr Leu  
65 70 75 80

Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Val His Leu Ala Cys Gln  
                             85                            90                            95  
 Gly Leu Trp Thr Gly Glu Thr Asp Leu Ala Leu Ala Gly Gly Val Trp  
                             100                            105                            110  
 Ile Gln Cys Thr Pro Gly Phe Leu Ile Ser Ser Ser Arg Ala Gly Met  
                             115                            120                            125  
 Leu Ser Pro Thr Gly Gln Cys Arg Ala Phe Gly Ala Gly Ala Asp Gly  
                             130                            135                            140  
 Phe Val Pro Ser Glu Gly Val Gly Val Val Val Leu Lys Arg Leu Gln  
                             145                            150                            155                            160  
 Asp Ala Leu Asp Ala Gly Asp His Xaa Tyr Gly Val Ile Arg Gly Ser  
                             165                            170                            175  
 Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ala Ser Asn Gly Ile Thr Ala Pro Ser Ala  
                             180                            185                            190  
 Ala Ala Gln Glu Arg Leu Gln Arg His Val Tyr Asp Ser Phe Gly Ile  
                             195                            200                            205  
 Asp Ala Ser Arg Leu Gln Met Ile Glu Ala His Gly Thr Gly  
                             210                            215                            220

<210> 58

<211> 223

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 58

Pro Gln Glu Arg Val Leu Leu Glu Val Thr Trp Glu Ala Leu Glu Asp  
   1                            5                            10                            15  
 Ala Gly Gln Asp Val Asp Arg Leu Ala Gly Arg Pro Val Gly Val Phe  
                             20                            25                            30  
 Val Gly Ile Ser Ser Asn Asp Tyr Gly Gln Leu Gln Asn Gly Asp Pro  
                             35                            40                            45  
 Ala Asp Val Asp Ala Tyr Val Gly Thr Gly Asn Ala Leu Ser Ile Ala  
                             50                            55                            60

Ala Asn Arg Leu Ser Tyr Thr Phe Asp Phe Arg Gly Pro Ser Leu Ala  
65 70 75 80

Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Ile His Leu Ala Cys  
85 90 95

Gln Ser Val Arg Arg Gly Glu Ala Glu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val  
100 105 110

Asn Leu Ile Leu Thr Pro Gly Leu Thr Val Asn Phe Thr Arg Ala Gly  
115 120 125

Met Met Ala Pro Asp Gly Arg Cys Lys Thr Phe Asp Ala Ala Ala Asn  
130 135 140

Gly Tyr Val Arg Gly Glu Gly Ala Gly Val Val Val Leu Lys Pro Leu  
145 150 155 160

Ala Gln Ala Ile Ala Asp Gly Asp Pro Ile Tyr Ala Ile Val Arg Gly  
165 170 175

Ser Ala Val Asn Gln Asp Gly Arg Ser Asn Gly Leu Thr Ala Pro Asn  
180 185 190

Arg Gln Ala Gln Glu Val Val Leu Arg Ala Ala Tyr Arg Asp Ala Gly  
195 200 205

Ile Ser Pro Ala Asp Val Asp Ala Val Glu Ala His Gly Thr Gly  
210 215 220

<210> 59

<211> 235

<212> PRT

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence : organisme du sol

<400> 59

Pro Gln Gln Arg Val Phe Leu Glu Asp Ala Thr Glu Val Asp Val Asp  
1 5 10 15

Ala Leu Ser Asp Gly Glu Asp Val Val Ile Ala Gly Ile Met Gln His  
20 25 30

Ile Glu Glu Ala Gly Ile His Ser Gly Asp Ser Ser Cys Val Leu Pro  
35 40 45

Pro Val Asp Ile Pro Pro Lys Ala Leu Gln Thr Ile Arg Asp His Thr  
 50 55 60  
 Phe Lys Leu Ala Arg Ala Leu Lys Val Ile Gly Leu Met Asn Val Gln  
 65 70 75 80  
 Tyr Ala Ile Gln Arg Asp Lys Val Tyr Val Ile Glu Val Asn Pro Arg  
 85 90 95  
 Ala Ser Arg Thr Val Pro Tyr Val Ser Lys Ala Thr Gly Val Pro Leu  
 100 105 110  
 Ala Lys Val Ala Ser Arg Leu Met Thr Gly Arg Lys Leu His Glu Leu  
 115 120 125  
 Leu Pro Glu Gly Val Glu Arg Gly Trp Ile Thr Thr Ala Gly Glu Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Val Lys Ser Pro Val Phe Pro Trp Gly Lys Phe Pro Gly Val  
 145 150 155 160  
 Asp Thr Val Leu Gly Pro Glu Met Lys Ser Thr Gly Glu Val Met Gly  
 165 170 175  
 Val Ala Asp Asn Phe Gly Glu Ala Phe Ala Lys Ala Gln Ile Ala Ala  
 180 185 190  
 Gly Thr Tyr Leu Pro Thr Glu Gly Thr Val Phe Ile Ser Val Asn Asp  
 195 200 205  
 Arg Asp Lys Gly Asn Val Ile Gln Leu Ala Gln Arg Phe Ser Glu Leu  
 210 215 220  
 Gly Phe Gly Ile Val Asp Thr His Gly Thr Gly  
 225 230 235

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 1269

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 60

taacaggaag aagcttgctt ctttgctgac gagtggcgga cgggtgagta acacgtggga 60  
 acctgcctta tggttcggga taacgtctgg aaacggacgc taacaccgga tgtgcccttc 120

```

gggggaaagt ttacgccatg agagggggccc gcgctccgatt aggtagttgg tggggtaatg 180
gcccaccaag ccgacgatcg gtagctggtc tgagaggatg atcagccaca ctgggactga 240
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attggacaat gggggcaacc 300
ctgatccagc aatgcccgct gagtgatgaa ggccttaggg ttgtaaagct ctttcgcacg 360
cgacgatgat gacggtagcg tgagaagaag ccccggttaa cttcgtgcca gcagcccgcg 420
taatacgaag ggggagcgagc ttgttcggaa ttactgggag taaaggcgcg gtaggcggcc 480
cgatcagtca gatgtgaaag ccccgggctc aacctgggaa ctgcatttga tactgtcggg 540
cttgagttcc ggagaggatg gtggaattcc cagtgtagag gtgaaattcg tagatattgg 600
gaagaacacc ggtggcgaag gcggccatct ggacggacac tgacgctgag gcgcgaaagc 660
gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaaccgat gaatgctaga 720
cgctgggggtg catgcacttc ggtgtcgccg ctaacgcatt aagcattccg cctggggagt 780
acggccgcaa ggttaaaact caaaggaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg 840
tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct taccaacct tgacatgtcc attgccggtc 900
cgagagattg gaccttcagt tcggctggat ggaacacagc tgctgcatgg ctgtcgtcag 960
ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctac cgccagttgc 1020
atcattcag ttgggcactc tgggtggaact gccggtgaca agccggagga aggcggggat 1080
gacgtcaagt cctcatggcc cttatgggtt gggctacaca cgtgctacaa tagcggtgac 1140
agtgggacgc gaagtcgcaa gatggagcaa atcccaaaa gccgtctcag ttcggattgc 1200
actctgcaac tcgggtgcat gaagttggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcacgcccg 1260
gtgaatacg                                     1269

```

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 1500

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 61

```

ttttaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tggggccctct 60
gatgcatgc tcgagcggcc gccagtgtga tggatatctg cagaattcgc ccttcaggcc 120
caacacatgc aagtcgaacg agggcttcgg ccctagtggc gcacgggtga gtaacacgtg 180
ggaacctgcc ttatggttcg ggataacgtc tggaaacgga cgtaaacacc ggatgtgccc 240
ttcgggggaa agtttacgcc atgagagggg cccgcgtccg attaggtagt tgggtgggta 300
atggcccacc aagccgacga tcggtagctg gtctgagagg atgacagcc aactgggac 360
tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattggac aatgggggca 420
accctgatcc agcaatgccg cgtgagtgat gaaggcctta gggttgtaaa gctctttcgc 480
acgcgacgat gatgacggta gcgtgagaag aagccccggc taacttcgtg ccagcagccg 540
cggtaatacg aagggggcgga gcgttggtcg gaattactgg gcgtaaaggg cgcgtaggcg 600
gcccgatcag tcagatgtga aagccccggg ctcaacctgg gaactgcatt tgatactgtc 660
gggcttgagt tccggagagg atggtggaat tccagtgta gaggtgaaat tcgtagatat 720
tgggaagaac accggtggcg aaggcgcca tctggacgga cactgacgct gaggcgcgaa 780
agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatgct 840
agacgtggg gtgcatgcac ttcggtgtcg ccgctaacgc attaagcatt ccgcctgggg 900
agtacggccg caaggttaaa actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc 960
atgtggttta attcgaagca acgcgcagaa ccttaccaac ccttgacatg tccattgccg 1020
gtccgagaga ttggaccttc agttcggtcg gatggaacac aggtgctgca tggctgtcgt 1080
cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc taccgccagt 1140

```

```

tgccatcatt cagttgggca ctctggtgga actgccggtg acaagccgga ggaaggcggg 1200
gatgacgtca agtcctcatg gcccttatgg gttgggctac acacgtgcta caatggcggg 1260
gacagtggga cgcgaagtcg caagatggag caaatcccca aaagccgtct cagttcggat 1320
tgcactctgc aactcgggtg catgaagttg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc 1380
gcggtgaata cgttcccggg cttgttacac accgccaag ggcgaattcc agcacactgg 1440
cggccggttac tagtggatcc gagctcggtg ccaagcttgg cgtaatcatg gtcatactg 1500

```

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 1366

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 62

```

acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctatagggcg aattgggccc tctagatgca 60
tgctcgagcg gccgccagtg tgatggatat ctgcagaatt cgcccttcag gcctaacaca 120
tgcaagtcga acgaaggctt cggccttagt ggcgcacggg tgagtaacac gtgggaacct 180
gcctttcggg tcggaataac gtctggaaac ggacgctaac accggatacg cccttcgggg 240
gaaagtccac gccgagagag gggcccgcgt cggattaggt agttggtgag gtaatggctc 300
accaagcctt cgatccgtag ctggtctgag aggatgatca gccacactgg gactgagaca 360
cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg ggaatattg gacaatgggc gcaagcctga 420
tccagcaatg ccgcgtgagt gatgaaggcc ttagggttgt aaagctcttt cgcacgcgac 480
gatgatgacg gtacgctgag aagaagcccc ggctaacttc gtgccagcag ccgcggtaat 540
acgaaggggg ctacgcttgt tcggaattac tgggcgtaaa gggcgctag gcggcctgct 600
tagtcagaag tgaaagcccc gggctcaacc tgggaatagc ttttgatact ggcaggcttg 660
agttccggag aggatggttg aattcccagt gttagagtg aattcgtaga tattgggaag 720
aacaccggtg gcgaaggcgg ccactctggac ggacactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg 780
ggagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat gctagacgtc 840
ggggtgcatg cacttcggtg tcgccgctaa cgcattaagc attccgctg gggagtaagg 900
ccgcaagggt aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcg caagcgggtg agcatgtggt 960
ttaattcgaa gcaacgcgca gaaccttacc aacccttgac atgtccatta tgggcttcag 1020
agatgagggt cttcagttcg gctgggtgga acacagggtg tgcattggctg tcgtcagctc 1080
gtgtcgtgag atgttggtt aagtcgccgca acgagcgcaa cccctaccgt cagttgccat 1140
cattcagttg ggcactctgg tgaacccgcc ggtgacaagc cggaggaagg cggggatgac 1200
gtcaagtcct catggccctt atgggttggg ctacacacgt gctacaatgg cggtgacagt 1260
gggaagcgaa gtcgcgagat ggagcaaatc cccaaaagcc gtctcagttc ggatcgccact 1320
ctgcaactcg agtgcgtgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatc 1366

```

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 1360

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol



&lt;400&gt; 63

```

acagctatga ccatgattac gccaaagcttg gtaccgagct cggatccact agtaacggcc 60
gccagtgtgc tggaattcgc ccttcaggcc taacacatgc aagtcgaacg ccccgcaagg 120
ggagtggcag acgggtgagt aacgcgtggg aacataccct ttcctgcgga atagctccgg 180
gaaactggaa ttaataccgc atacgcccta cgggggaaag atttatcggg gaaggattgg 240
cccgcgttgg attagctagt tgggtgggta aaggcctacc aaggcgacga tccatagctg 300
gtctgagagg atgatcagcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc 360
agcagtgggg aatattggac aatgggcgca agcctgatcc agccatgccg cgtgagtgat 420
gaaggcctta gggttgtaaa gctctttcac cggagaagat aatgacggta tccggagaag 480
aagccccggc taacttcgtg ccagcagccg cggtaatacg aagggggcta gtgttggtcg 540
gaattactgg gcgtaaagcg cacgtaggcg gatatttaag tcaggggtga aatcccagag 600
ctcaactctg gaactgcctt tgatactggg tatcttgagt atggaagagg taagtggaaat 660
tccgagtgtg gaggtgaaat tcgtagatat tcggaggaac accagtggcg aaggcggctt 720
actggtccat tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
ggtagtcca cgccgtaaac gatgaatgtt agccgtcggg cagtatactg ttcggtggcg 840
cagctaacgc attaaacatt ccgcctgggg agtacggtcg caagattaaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgcagaa 960
ccttaccagc tcttgacatt cgggggttgg gcagtggaga cattgtcctt cagttaggct 1020
ggccccagaa caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgcg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc tcgcccttag ttgccagcat ttagttgggc actctaaggg 1140
gactgccggt gataagccga gaggaagggt gggacgacgt caagtcctca tggcccttac 1200
gggctgggct acacacgtgc tacaatggtg gtgacagtgg gcagcgagac agcgatgtcg 1260
agctaattct caaaagccat ctcagttcgg attgcactct gcaactcgag tgcataagat 1320
tggaatcgct agtaatcgca gatcagcatg tgcggtgaat 1360

```

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 1288

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 64

```

tccaggaaac agctatgacc atgattacgc caagcttggt accgagctcg gatccactag 60
taacggccgc cagtgtgctg gaattcgcgc ttcaggccta acacatgcaa gtcgagcgcc 120
ccgcaagggg agcggcagac ggggtgagtaa cgcgtgggaa tctacccatc cctacggaac 180
aactccggga aactggagct aataccgtat acgccctttg ggggaaagat ttatcgggga 240
tggtatgagc cgcgttggtt tagctagtgt gtggggtaaa ggcctaccaa ggcgacgatc 300
catagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg agacacggcc caaactccta 360
cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaag cctgatccag ccatgcccgc 420
gtgagtgatg aagggtcttag gattgtaaa ctctttcacc ggagaagata atgacgggat 480
ccggagaaga agccccggct aactttcgtg ccagcagccg cggtaatacg aagggggcta 540
gcgttggtcg gaattactgg gcgtaaagcg cacgtaggcg gatatttaag tcaggggtga 600
aatcccagag ctcaactctg gaactgcctt tgatactggg tatcttgagt atggaagagg 660
taagtggaaat tgcgagtgtg gaggtgaaat tcgtagatat tcgcaggaac accagtggcg 720
aaggcggctt actggtccat tactgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga 780
ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgaatgtt agccgtcggc aagtttactt 840
gtcgggtggcg cagctaacgc attaaacatt ccgcctgggg agtacggtcg caagattaaa 900

```

```

actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtgggttta attcgaagca 960
acgcgcagaa ccttaccagc ccttgacatg cccggacagc tacagagatg tagtggtccc 1020
ttcgggggacc gggacacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgctcg gagatgttgg 1080
gttaagtccc gcaacgagcg caaccctcgc ccttagttgc cagcattcag ttgggcactc 1140
taaggggact gccggtgata agccgagagg aagtggggat gacgtcaagt cctnatggcc 1200
cttacgggct gggctacaca cgtgctacaa tgggtgggtga cagtgggcag cgaaggaacg 1260
atcccgagct aatctccaaa agccatct 1288

```

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 1386

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 65

```

cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga attgggccct ctagatgcat 60
gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatata tgcagaattc gcccttcagg cctaacacat 120
gcaagtcgag cgggcgtagc aatacgtcag cggcagacgg gtgagtaacg cgtgggaaca 180
taccttttgg ttcggaacaa cacaggga aa cttgtgctaa taccggataa gcccttacgg 240
ggaaagattt atcgccgaaa gattggcccc cgtctgatta gctagtgggt agggtaatgg 300
cctaccaagg cgacgatcag tagctggtct gagaggatga tcagccacat tgggactgag 360
acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtgggggaata ttggacaatg ggcgcaagcc 420
tgatccagcc atgccgcgtg agtgatgaag gccctagggt tgtaaagctc ttttgtgcgg 480
gaagataatg acggtaccgc aagaataagc cccggctaac ttcgtgccag cagccgcggt 540
aatacgaagg gggctagcgt tgctcggaat cactgggcgt aaagggtgcg taggcgggtc 600
ttaagtcag gggtgaaatc ctggagctca actccagaac tgcctttgat actgaagatc 660
ttgagttcgg gagagggtgag tggaaactgcg agtgtagagg tgaaattcgt agatattcgc 720
aagaacacca gtgggcgaag gcggtcact ggcccgatac tgacgctgag gcacgaaagc 780
gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gaatgccagc 840
cgttagtggg tttactcact agtggcgcag ctaacgcttt aagcattccg cctggggagt 900
acggtcgcaa gattaaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg 960
tggtttaatt cgacgcaacg cgcagaacct taccagccct tgacatgtcc aggaccggtc 1020
gcagagatgt gaccttctct tcggagcctg gagcacagg gctgcatggc tgtcgtcagc 1080
tcgtgctcgt agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccccgtc cttagtgtgct 1140
accatttagt tgagcactct aaggagactg ccggtgataa gccgcgagga aggtggggat 1200
gacgtcaagt cctcatggcc cttacgggct gggctacaca cgtgctacaa tggcgggtgac 1260
aatgggacgc taaggggcaa cccttcgcaa atctcaaaaa gcccgctctca gttcggattg 1320
ggctctgcaa ctcgagccca tgaagttgga atcgctagta atcggtggatc agcacgccac 1380
ggtgaa 1386

```

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1223

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 66

```

agcggcagag ggtgagtaac gcgtgggaat ctacccatct ctacggaaca actccgggaa 60
actggagcta ataccgtata cgtccttcgg gagaaagatt tatcggagat ggatgagccc 120
gcgttggatt agctagttagg tggggtaaat gcctaccaag gcgacgatcc atagctggtc 180
tgagaggatg atcagccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 240
agtgggggaat attggacaat gggcgaaagc ccgatccagc catgccgcgt gagtgatgaa 300
ggccctaggg ttgtaaagct ctttcaacgg tgaggataat gacggtaacc gtagaagaag 360
ccccggctaa cttcgtgccca gcagccgcgg taatacgaag ggggctagcg ttgttcggaa 420
ttactgggcg taaagcgcac gtaggcggac tattaagtca ggggtgaaat cccggggctc 480
aaccccgaa ctgcctttga tactggtagt ctcgagtccg gaagaggtga gtggaattcc 540
gagtgtagag gtgaaattcg tagatattcg gaggaacacc agtggcgaag gcggctcact 600
ggtccggtac tgacgctgag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg 660
agtccacgc cgtaaacgat ggaagctagc cgttggcaag tttacttgtc ggtggcgag 720
ctaacgcatt aagcttccc cctggggagt acggtcgcaa gattaaaact caaaggaatt 780
gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgcagaacct 840
taccagccct tgacatccc gtcgcggtta ccagagatgg tacccttcag ttcggctgga 900
ccggtgacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 960
cgcaacgagc gcaaccctcg cccttagttg ccagcattca gttgggcact ctaaggggac 1020
tgccggtgat aagccgagag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg cccttacggg 1080
ctgggctaca cacgtgctac aatgggtggg acagtgggca gcgagaccgc gaggtcgagc 1140
taatctccaa aagccatctc agttcggatt gcactctgca actcgagtgc atgaagttgg 1200
aatcgctagt aatcgcggat cag 1223

```

<210> 67

<211> 1237

<212> ADN

<213> Organime Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 67

```

cccgcagggg agtggcagag ggtgagtaac gcgtgggaat ctaccctttt ctacggaaca 60
actgagggaa acttcagcta ataccgtata cggccgagag gcgaaagatt tatcggagaa 120
ggatgagccc gcgttggatt agctagttagg tggggtaaaag gcctaccaag gcgacgatcc 180
atagctggtc tgagaggatg atcagccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac 240
gggaggcagc agtgggggaat attggacaat gggcgcaagc ctgatccagc catgccgcgt 300
gagtgatgaa ggccctaggg ttgtaaagct ctttcaccgg tgaagataat gacggtaacc 360
ggagaagaag ccccggttaa cttcgtgccca gcagccgcgg taatacgaag ggggctagcg 420
ttgttcggat ttactgggcg taaagcgcac gtaggcggac tattaagtca ggggtgaaat 480
cccggggctc aaccccgaa ctgcctttga tactggtagt cttgagttcg aaagaggtga 540
gtggaattcc gagtgtagag gtgaaattcg tagatattcg gaggaacacc agtggcgaag 600
gcggctcact ggctcgatac tgacgctgag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta 660
gataccctgg tagtccacgc cgtaaaactat gagagctagg cgtcgggcag tatactgttc 720
ggtggcgag ctaacgcatt aagctcttcg cctggggagt acggtcgcaa gattaaaact 780
caaaggaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg 840
cgcagaacct taccagccct tgacatccc atcgcggtta ccagagatgg tacccttcag 900

```

```

ttaggctgga tcggtgacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg 960
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg cccttagttg ccatcattca gttggggcact 1020
ctaaggggac tgccggtgat aagccgagag gaagggtggg atgacgtcaa gtcctcatgg 1080
cccttacggg ctgggctaca cacgtgctac aatgggtggc acagtgggca gcgagaccgc 1140
gaggtcgagc taatctccaa aagccatctc agttcggatt gcactctgca actcgagtgc 1200
atgaagttgg aatcgctagt aatcgtggat cagaatg 1237

```

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 1346

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 68

```

acgacggggc agtgaattgt aatacgactc actatagggc gaattggggc ctctagatgc 60
atgctcgagc ggccgccagt gtgatggata tctgcagaat tcgcccttca ggcctaacac 120
atgcaagtcg aacggatccc ttcggattag tggcggacgg gtgagtaaca cgcgggaacg 180
tgcccttttg ttcggaacaa ctcagggaaa cttgagctaa taccggataa gcctttcgag 240
ggaaagattt atcgccattg gagcgggccc cgtaggatta gctagtgggt gaggtaaaag 300
ctcaccaagg cgacgatcct tagctggtct gagaggatga tcagccacat tgggactgag 360
acacggccca aactcctacg ggaggcagca gtgggggaatc ttgcgcaatg ggcgaaagcc 420
tgacgcagcc atgccgcgtg aatgatgaag gtcttaggat tgtaaaattc tttcacgggg 480
gacgataatg acggtaccgg gagaagaagc cccggctaac ttcgtgccag cagccgcggt 540
aatacgaagg gggctagcgt tgctcggaat tactgggcgt aaaggggagc taggcggata 600
gttttagtcag aggtgaaagc ccagggtcca accttggaat tgcctttgat actggctatc 660
ttgagtacgg aagaggtatg tggaactccg agtgtagagg tgaaattcgt agatattcgg 720
aagaacacca gtggcgaagg cgacatactg gtccgttact gacgctgagg ctcgaaagcg 780
tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgct gtaaacgatg agtgctagtt 840
gtcggcatgc atgcatgtcg gtggcgcagc taacgcatta agcactccgc ctgggggagta 900
cggtcgcaag attaaaactc aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt 960
ggtttaattc gaagcaacgc gcagaacctt accacctttt gacatgcccg gaccgctcca 1020
gagatggagc tttcccttcg gggactggga cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg 1080
tgctcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgctatt agttgccatc 1140
aggtttggct gggcactcta ataggaccgc cgggtggttaag ccggaggaag gtgggggatga 1200
cgtcaagtcc tcatggccct tacaaggtgg gctacacacg tgctacaatg gcgactacag 1260
agggctgcaa tcccgcgagg gggagccaat ccctaaaagt cgtctcagtt cggattgcac 1320
tctgcaactc gagtgcatag agttgg 1346

```

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 1500

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 69

```

acagctatga ccatgattac gccaaagcttg gtaccgagct cggatccact agtaacggcc 60
gccagtgtgc tggaaattcgc ccttcaggcc taacacatgc aagtcgaacg ccgtagcaat 120
acggagtggtc agacgggtga gtaacacgtg ggaacgtgcc ctttggttcg gaacaacaca 180
gggaaacttg tgctaatacc gaataagccc ttacggggaa agatttatcg ccaaaggatc 240
ggccccgcgtc tgattagcta gttggtgggg taacggccca ccaaggctac gatcagtagc 300
tgggtctgaga ggatgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 360
gcagcagtta ggaatccttg acaatgggag caagcctgat ccagccatgc cgcgtgagtg 420
atgaaggcct tagggttgta aagctcttcc agcggggaag ataatgacgg taccgcaga 480
agaagccccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata cgaagggggc tagcgttgct 540
cggaatcact gggcgtaaaag cgcacgtagg cggatcttta agtcaggggt gaaatcctgg 600
agctcaactc cagaactgcc tttgatactg gggatctcga gtccggaaga ggtgagtggg 660
actccgagtg tagaggtgaa attcgtagat attcggaga acaccagtgg cgaaggcggc 720
tactgggtcc ggtactgacg ctgaggtgag aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac 780
ctggtagtc cacgccgtaa acgatggatg ctagccgttg gcgggtttac tcgtcagtg 840
cgcagctaac gcattaagca tcccgcctgg ggagtagcgt cgcaagatta aaactcaaag 900
gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt caattcgaag caacgcgcag 960
aaccttacca gcccttgaca tgtcccgat ggacttcaga gatgaggtcc ttcagttcgg 1020
ctggcgggaa cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttggttta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgccctt agttgccatc atttagttgg gcactctaag 1140
gggactgccg gtgataagcc gcgaggaagg tggggatgac gtcaagtcct catggccctt 1200
acgggctggg ctacacacgt gctacaatgg cggtagacgt gggacgcaat ggagcaatcc 1260
tgcgcaaatc tcaaaaagcc gtctcagttc ggattggggg ctgcaactcg accccatgaa 1320
gtcgggaatc ctagtaatcg cagatcagca cgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt 1380
acacaccgcc caagggcgaa ttctgcagat atccatcaca ctggcgcccg ctcgagcatg 1440
catctagagg gcccaattcg ccctatagtg agtcgtatta caattcactg gccgtcgttt 1500

```

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 1113

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 70

```

gagctaatac cgtataatga cttcgggtcca aagatttata gcctgaggat gagcccgcgt 60
cggattagct agttggtagg gtaaaagcct accaaggcga cgatccgtag ctggtctgag 120
aggatgatca gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg 180
gggaatattg gacaatgggg gcaagcctga tccagcaatg ccgctgagtg gatgaaggcc 240
ttaggggtgt aaagctcttt taccgggaa gataatgact gtaccgggag aataagcccc 300
ggctaactcc gtgccagcag ccgcggtaat acggaggggg ctagcgttgt tcggaattac 360
tgggcgtaaa gcgcacgtag gcggctttgt aagttagagg tgaaagcccg gggctcaact 420
ccggaattgc ctttaagact gcatcgctcg aattgtggag aggtaagtgg aattccgagt 480
gtagaggtga aattcgtaga tattcggaag aacaccagtg gcgaaggcga cttactggac 540
acatattgac gctgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaca ggattagata ccctggtagt 600
ccacgccgta aacgatgatg actagctgtc ggggcgctta gcgtttcggt ggcgagcta 660
acgcgttaag tcatccgcct ggggagtagc gccgcaaggt taaactcaaa gaaattgacg 720
ggggcctgca caagcggtag agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgca gaaccttacc 780

```

```

agcggtttgac atgccaggac ggtttccaga gatggattcc ttcccttacg ggacctggac 840
acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac 900
gagcgcaacc ctcgtcttta gttgctacca tttagttagg cactctagag aaactgccgg 960
tgataagccg gaggaagggtg gggatgacgt caagtcctca tggcccttac gcgctgggct 1020
acacacgtgc tacaatggcg gtgacaacgg gcagcaaact cgcgagagtg agcaaattccc 1080
gaaaagccgt ctcagttcgg attgttctct gca
1113

```

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 1225

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 71

```

ggagcggcgg acgggtgagt aacgcgtggg aacgtgccct ttggtacgga acaactgagg 60
gaaacttcag ctaataaccgt atgtgccctt cgggggaaag atttatcgcc attggagcgg 120
cccgcgttgg attaggtagt tgggtgggta aaggcctacc aagcctacga tccatagctg 180
gtctgagagg atgatcagcc acactgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc 240
agcagtaggg aatcttgcg aatgggcgaa agcctgacgc agccatgccg cgtgtatgat 300
gaaggtctta ggattgtaaa atactttcac cggggaagat aatgacggta cccggagaag 360
aagccccggc taacttcgtg ccagcagccg cggtataacg aaggggggcta gcgttgctcg 420
gaattactgg gcgtaaaggg cgcgtaggcg gatatttaag tcgggggtga aagcccaggg 480
ctcaaccctg gaattgcctt cgatactgga tatcttgagt tcgggagagg tgagtggaaat 540
gccgagtgtg gaggtgaaat tcgtagatat tcggcggaac accagtggcg aaggcgactc 600
actggcccgga tactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 660
tggtagtcca cgctgtaaac gatgagtgtc agttgtcggc atgcatgcat gtcggtgacg 720
cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggctc caagattaaa actcaaagga 780
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgcagaa 840
ccttaccacc ttttgacatg ccctgatcgc tggagagatc cagttttccc ttcggggaca 900
gggacacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gtttaagtccc 960
gcaacgagcg caaccctcgc cattagtgtc catcattaag ttgggcactc taatgggacc 1020
gccggtggta agccggagga aggtggggat gacgtcaagt cctcatggcc cttacggggg 1080
gggctacaca cgtgctacaa tggcgactac agagggttgc aaacctgcga aggggagcta 1140
atccctaaaa gtcgtctcag ttcggattgc actctgcaac tcgagtgcac gaagtcggaa 1200
tcgctagtaa tcgcggatca gcatg
1225

```

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 1286

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 72

```

atgattagta gcaataactaa tcgatgacga gcggcggacg ggtgagtaat acgtaggaa 60

```

```

ctgcccttaa gcggggggata actaagggaa acttttagcta ataccgcata aactcgagag 120
agaaaagctg cagcaatgtg gcacttgagg aggggcctgc gtcagattag ctagttggtg 180
aggtaatagc tcaccaaggc gatgatctgt aactggtctg agaggacgac cagtcacact 240
gggactgaga cacggcccgag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg 300
gggcaaccct gatccagcga tgcgcgctgg gtgaagaagg ccttcggggt gtaaagccct 360
ttaggtcggg aagaagggtta gtagaggaaa tgctattaac ttgacggtac cgacagaata 420
agcaccggca aactctgtgc cagcagccgc ggtaatacag aggggtgcgag cgtaaatcgg 480
atttactggg cgtaaagggc gcgtaggcgg tgagatgtgt gtgatgtgaa agccccaggc 540
tcaacctggg aagtgcacgc caaactgtct gactggagta tatgagaggg tggcggaatt 600
tccggtgtag cggtgaaatg cgtagagatc ggaaggaaac tcgatggcga aggcagccac 660
ctggcataat actgacgctg aggcgcgaaa gcgtggggat cgaacaggat tagataccct 720
ggtagtccac gctgtaaact atgagtacta gatgttggtg ggggaacctt tgggtatcga 780
agctaacgcg ataagtattc cgctgggaa gtacggccgc aagggtgaaa ctcaaatgaa 840
ttgacggggg ccgcacaaag cggtgaggca tgtggtttaa ttcgatgcaa cgcgaagaac 900
ttacctacc cttgacatcc tgagaatctg gcttagtagc tggagtgcgc aaaggagctc 960
agagacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgttggt agatgttggg ttaagtcccg 1020
taacgagcgc aacccttgcc cttagtgtgc atcatttagt tggggactct aaggggaccg 1080
ccagtgatga actggaggaa ggcggggacg acgtcaagtc atcatggcct ttatgggtag 1140
ggccacacac gtgctacaat ggggcgtacg gagggtcgca aaccgcgag ggggagctaa 1200
tctcataaag cgtctcgtag tccggattgg agtctgcaac tcgactccat gaagttggaa 1260
tcgctagtaa tcgcgaatca gcattg 1286

```

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 1288

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 73

```

cggggcaacc ctggcggcga gcggcgaacg ggtgagtaat gcatcggaac gtgtcctctt 60
gtgggggata accagtcgaa agactggcta ataccgcatg agatcgaaaag atgaaagcag 120
gggaccgcaa ggccttgccg gagaggagca gccgatgccg gattagctag ttggtggggg 180
aaaagcctac caaggcgacg atccgtagct ggtctgagag gacgaccagc cacactggga 240
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaattttgga cagtgggggc 300
aaccctgatc cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggcctt cgggttgtaa agcactttcg 360
gacggaacga aatcgcgca gttaatagtt cgcggtggatg acggtaccgt aagaagaagc 420
accggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gtgcgagcgt taatcggaat 480
tactgggcgt aaagtgtgcg caggcggcct cgcaagtcga gtgtgaaatc cccgagctta 540
acttgggaat tgcgctcgaa actacggagc cggagtgtgg cagaggaagg tgggaattcca 600
cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacaccg atggcgaggc cggccttctg 660
ggccaacact gacgctcatg cacgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggg 720
agtccacgcc ctaaacgatg atgactagtt gttggaggag ttaaactcct tagtaacgca 780
gctaacgcgt gaagtcatcc gcctggggag tacggtcgca agattaaaac tcaaaggaat 840
tgacgggggc ccgcacaagc ggtggatgat gtggtttaat tcgatgcaac gcgaaaaacc 900
ttacctaccc ttgacatgct aggaacgctg cagaaatgta gcggtgcccg aaagggaacc 960
tagacacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgtcgtg gagatgttgg gttaagtccc 1020
gcaacgagcg caaccctgc cattagtgtg tacattcagt tgagcactct aatgggactg 1080

```

```

ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc ctcattggccc ttatgggtag 1140
ggctacacac gtcatacaat ggcgcgtaca gagggttgcc aaccgcgcgag ggggagccaa 1200
tcccagaaag cgcgtcgtag tccggattgg agtctgcaac tcgactccca tgaagtcgga 1260
atcgctagta atcgcggtatc agcatgtc 1288

```

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 600

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 74

```

cgtgccagca gccgcggttaa tacgtagggtg gcaagcgttg tccggaatta ttggggcgtaa 60
agcgcgcgca ggtgggtttct taagtctgat gtgaaagccc acggcttaac cgtggagggt 120
cattggaaac tgggagactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaattccaag tgtagcgggtg 180
aaatgcgtag agatttgag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggt ctgcaactga 240
cgctgaggcg cgaaagcatg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccatgccgt 300
aaacgatgag tgctaagtgt taggggggttt ccgcccctta gtgctgcagc taacgcatta 360
agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc aaaggaattg acggggggccc 420
gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt 480
gacatcccgat tgancgtct agagatagag ttttcccttc ggggacattg gtgacagggt 540
gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca 600

```

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 601

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 75

```

cgtgccagca gccgcggttaa tacgtagggtg gcaagcgttg tccggaatta ttggggcgtaa 60
agcgcgcgca ggtgggtttct taagtctgat gtgaaagccc acggcttaac cgtggagggt 120
cattggaaac tgggagactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaattccaag tgtagcgggtg 180
aaatgcgtag agatttgag gaacaccagt ggcgaaggcg actttctggt ctgcaactga 240
cgctgaggcg cgaaagcatg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccatgccgt 300
aaacgatgag tgctaagtgt taggggggttt ccgcccctta gtgctgagct aacgcattaa 360
gcactccgcc tggggagtag gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cggggggccc 420
cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccagggtctt 480
acatcccgat gacgctctag agatagagtt ttccttcgg ggacattggt gacagggtggt 540
gcatgggttg cgtcagctcg tgctcgtgaga tgttgggtta agtcccgc aa cgagcgccacc 600
c 601

```

&lt;210&gt; 76



&lt;211&gt; 1236

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 76

```

tgccctgtag acgggggataa cttcgggaaa ccggagctaa taccggataa tcctcttccc 60
cacatgggga agagttgaaa ggcgctttcg cgtcactaca ggatgggccc gcggtgcatt 120
agctagttgg tagggtaacg gcctaccaag gcgacgatgc atagccgacc tgagaggggtg 180
atcgcccaaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat 240
cttcacaaat ggacgaaagt ctgatggagc aacgccgcgt gagtgatgaa ggttttcggg 300
tcgtaaaact ctggtgtaag ggaagaacca gtacgtcagg caatggacgt accttgacgg 360
taccttatta gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc 420
aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag cgcgcgcagg tggtttctta agtctgatgt 480
gaaagcccac ggcttaaccg tggaggggtca ttggaaactg ggagacttga gtgcagaaga 540
ggaaagtgga attccaagtg tagcggcgaa atgcgtagag atttgaggga acaccagtgg 600
cgaaggcgac tttctggtct gcaactgacg ctgaggcgcg aaagcatggg gagcaaacag 660
gattagatac cctggtagtc catgctgtaa acgatgagtg ctaagtgtta gggggtttcc 720
gccccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtagc accgcaaggt 780
tgaaactcaa aggaattgac gggggccccgc acaagcgggt gagcatgtgg ttaattcga 840
agcaacgca agaaccttac caggtcttga catcccgatg atcgctctgg agatagagtt 900
ttcccttcgg ggacattggt gacaggtggg gcatggttgt cgtcagctcg tgcgtgaga 960
tggtgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttaatctt agttgccatc atttagttgg 1020
gcaactaag gtgactgccg gtgataaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc 1080
atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cggtaaaaag agtcgctaac 1140
tcgcgagagt atgctaattc catagaaccg ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg 1200
cctacatgaa gccggaatcg ctagtaatcg cggatc 1236

```

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 815

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 77

```

caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag gcggtttgtc gcgtctgctg 60
tgaaaactcg aggctcaacc tcgggcttgc agtgggtacg ggcagactag agtgcggtag 120
gggtgactgg aattcctggt gtagcgggtg aatgcgcaga tatcaggagg aacaccgatg 180
gcgaaggcag gtcactgggc cgcaactgac gctgaggagc gaaagcatgg ggagcgaaca 240
ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgttgggc actaggtgtg gggctcattc 300
cacgagttcc gtgccgcagc aaacgcatta agtgccccgc ctggggagta cggccgcaag 360
gcttaaaact caaagaaatt gacggggggc cgcacaagcg gcggagcatg cggattaatt 420
cgatgcaacg cgaagaacct taccaaggct tgacatacac cggaaacttc cagagatggg 480
tgccccgcaa ggtcgggtgta caggtgggtg atggttgctg tcagctcgtg tcgtgaagat 540
gttgggttaa gtcccgcgaac gacgcgaacc ctcgtcctat gttgccagca cgtgatgggt 600

```

```

gggactcata ggagactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac gtcaaatacat 660
catgcccctt atgtcttggg cttcacgcat gctacaatgg ccggtacaaa gggctgcat 720
accgcaaggt ggagcgaatc ccaaaaagcc ggtctcagtt cggattgggg tctgcaactc 780
gaccccatga agtcggagtc gctagtaatc gcaga 815

```

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 826

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 78

```

tcgtaggtgg cttgtcacgt cgggtgtgaa agcttggggc ttaactccag gtctgcattc 60
gatacgggct ggctagaggt aggtagggga gaacggaatt cctgggtgtag cggtgaaatg 120
cgcagatatc aggaggaaca ccggtggcga aggcggttct ctgggcctta cctgacgctg 180
aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac gctgtaaacg 240
ttgggcgcta ggtgtgggga ccttccacgg tttccgcgcc gtagctaacg cattaagcgc 300
cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca 360
agcggcggag catgttgctt aattcgacgc aacgcgaaga accttaccaa ggcttgacat 420
cgcccggaaa gcttcagaga tggagccctc ttcggactgg gtgacagggt gtgcatggct 480
gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgctc 540
aatgttgcca gcaacatcct tcgggggtgg tggggactca ttggagactg ccgggggtcaa 600
ctcggaggaa ggtggggagc acgtcaagtc atcatgcccc ttatgtcttg ggctgcaaac 660
atgctacaat ggccggtaca gaggggttgcg ataccgcaag gtggagcgaa tccctaaaag 720
ccggtctcag ttcggattgg ggtctgcaac tcgaccccat gaagtcggag tcgctagtaa 780
tcgcagatca gcaacgctgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtac 826

```

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 799

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 79

```

cgtaggcggg ttgtcgcgtc tgccgtgaaa gtccgggggt caactccgga tctgcgggtgg 60
gtacgggcag actagagtga ttagggggag actggaattc ctggtgtagc ggtgaaatgc 120
gcagatatca ggaggaacac cgatggcgaa ggcagggtctc tgggcattaa ctgacgctga 180
ggagcgaaaag catggggagc gaacaggatt agataccctg gtagtccatg ccgtaaacgt 240
tgggcactag gtgtggggga cattccacgt tttccgcgcc gtagctaacg cattaagtgc 300
cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca 360
agcggcggag catgcggatt aattcgatgc aacgcgaaga accttaccaa ggcttgacat 420
gaaccggaac cacctggaaa caggtgcccc gcttgcggtc ggtttacagg tgggtgcatgg 480
ttgtcgtcag ctggtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctcgt 540
tctatgttgc cagcgcgtta tggcggggac tcataggaga ctgccggggg caactcggag 600

```

```

gaagggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ttggggcttca cgcattgctac 660
aatggccgggt acaaagggtt gcgatactgt gaggtggagc taatcccaaa aagccgggtct 720
cagttcggat tgggggtctgc aactcgaccc catgaagtcg gagtcgctag taatcgcaga 780
tcagcaacgc tgcggtgaa                                     799

```

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 1250

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 80

```

tgccagcttg ctggtggatt agtggcgaac ggggtgagtaa cacgtgagta acctgccctt 60
aactctggga taagcctggg aaactgggtc taatgccgga tatgactcct catcgcatgg 120
tggggggtgg aaagcttttt gtgggttttg atggactcgc ggcctatcag cttgttggtg 180
aggtaatggc tcaccaaggc gacgacgggt agccggcctg agaggggtgac cggccacact 240
gggactgaga cacggcccag acttctacgg gaggcagcag tggggaatat tgcacaatgg 300
gcgaaagcct gatgcagcga cgccgcgtga gggatgacgg ctttcgggtt gtaaacctct 360
ttcagtaggg aagaagcgaa agtgacggta cctgcagaag aagcgccggc taactacgtg 420
ccagcagccg cggtataacg tagggcgcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagag 480
ctcgtaggcg gtttgcgcgc tctgccgtga aagtccgggg ctcaactccg gatctgcggg 540
gggtacgggc agactagagt gatgtagggg agactggaat tcctgggtga gcggtgaaat 600
gcgcagatat caggaggaac accgatggcg aaggcaggtc tctgggcatt aactgacgct 660
gaggagcgaa agcatgggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac 720
gttgggcact aggtgtgggg gacattccac gttttccgcg ccgtagctaa cgcattaagt 780
gccccgcctg gggagtacgg ccgcaaggct aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcg 840
caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgag gaaccttacc aaggcttgac 900
atgaaccgga aatacctgga aacagggtgc ccgcttgcg tccggtttaca ggtggtgcat 960
gttgccgctc agctcgtgtc gtgagatgtt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc 1020
gttctatgtt gccagcgcgt tatggcgggg actcatagga gactgccggg gtcaactcgg 1080
aggaaggtgg ggacgacgtc aaatcatcat gccccttatg tcttgggctt cagcatgct 1140
acaatggccg gtacaaaggg ttgcgatact gtgaggtgga gctaatacca aaaagccggg 1200
ctcagttcgg attgggggtc gcaactcgac cccatgaagt cggagtcgct 1250

```

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 1210

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 81

```

cgctaatacc ggatacggcg cgagagtctt cggactttcg cgagaaagat tcgcaaggat 60
cactgaggga cgagcctgcg gcccatcagc tagttggtga ggtaagagct caccaaggct 120
aagacgggta gctggtctga gaggatgatc agccacactg gaactgagac acggtccaga 180

```

```

ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt gcgcaatggg cgaaagcctg acgcagccac 240
gccgcgtgag cgatgagggc cttcgggtcg taaagctctg tggggagaga cgaataaggc 300
cgggtgaagag tcggccttga cggtatctcc ttagcaagca ccggctaact ccgtgccagc 360
agccgcggta atacggaggg tgcaaacggt gctcggaatc attgggcgta aagcgcacgt 420
aggcggcgtg ataagttggg tgtgaaagcc ctgggctcaa cccaggaagt gcattcaaaa 480
ctgtcacgct tgaatctcgg aggggggtcag agaattcccg gtgtagaggt gaaattcgta 540
gatatcggga ggaataccag tggcgaaggc gctggcctgg acgaagattg acgctgaggt 600
gcgaaagcgc ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccgcgctg taaacgatga 660
gtgctagacg ggggaggtat tgaccccttc gctgccgaag ctaacgcgtt aagcactccg 720
cctggggagt acggtcgcaa gactaaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg 780
gtggagcatg tggtttaatt cgacgcaacg cgcaaaacct tacctgggtt aaatccgccg 840
gaacctggct gaaaggctgg ggtgccctcc ggggaatcgg tgagaagggt ctgcatggct 900
gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccctatcg 960
tcagttgcca acattaaggt gggaactctg gcgagactgc cgggtctaaac cggaggaagg 1020
tggggacgac gtcaagtcct catggccctt atgcccaggg ctacacacgt gctacaatgg 1080
ctggtacaat gagccgcaaa accgcgaggt caagctaate tcaaaaaacc agtctcagtt 1140
cggatcggag tctgcaactc gactccgtga agctggaatc gctagtaate gaagatcagc 1200
acgctttcgg                                     1210

```

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 1272

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 82

```

gatgccagct tgctgggtgga ttagtgggcga acgggtgagt aacacgtgag taacctgccc 60
ttaactctgg gataagcctg ggaaactggg tctaataaccg gatatgactc ctcatcgcat 120
ggtgggggggt ggaaagcttt ttgtggtttt ggatggactc gcggcctatc agcttggttg 180
tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagaggggt accggccaca 240
ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat 300
gggcgaaagc ctgatgcagc gacgccgctg gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct 360
ctttcagtag ggaagaagcg aaagtgcggt tacctgcaga agaagcgccg gctaactacg 420
tgccagcagc cgcggttaata cgtagggcgc aagcgttatc cggaattatt gggcgtaaa 480
agctcgtagg cggtttgtcg cgtctgccgt gaaagtcccg ggctcaactc cggatctgcg 540
gtgggtacgg gcagactaga gtgatgtagg ggagactgga attcctgggt tagcggtgaa 600
atgcgcagat atcaggagga acaccgatgg cgaaggcagg tctctgggca ttaactgacg 660
ctgaggaacg aaagcatggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc catgccgtaa 720
acgttgggca ctaggtgtgg gggacattcc acgttttccg cgccgtagct aacgcattaa 780
gtgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccc 840
cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg 900
acatgaaccg gaaataacct gaaacaggtg ccccgcttgc ggtcggttta caggtggtgc 960
atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacac agcgcaaccc 1020
tcgttctatg ttgccagcgc gttatggcgg ggactcatag gagactgccg ggggtcaactc 1080
ggaggaagggt ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgtcttgggc ttcacgcatg 1140
ctacaatggc cggtaaaaag ggttgcgata ctgtgaggtg gagctgatcc caaaaagccg 1200
gtcccagttc ggattgggggt ctgcaactcg accccatgaa gtcggagtcg ctagtaatcg 1260

```

cagatcagca ac

1272

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 1247

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 83

```
tggttagtag caatactaaa tgatgacgag cggcggacgg gtgaggaaca cgtaggaacc 60
tgcccaagag agggggacaa ccaagggaaa ctttggctaa taccgcataa tctctacgga 120
gaaaagttgc ccgtaagggt ggcgcttttg gaggggcctg cgtccgatta gttagttggt 180
gaggtaatag ctcaccaaga ctgtgatcgg taactggtct gagaggacga ccagtcacac 240
tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatc ttggacaatg 300
ggggcaaccc tgatccagcg atgccgcgtg ggtgaagaag gccttcgggt tgtaaagccc 360
tttaggcggg gaagaaggat atgggatgaa taagcctgta ttttgacggg acccgagaa 420
taagcaccgg caaactctgt gccagcagcc gcggaatac agagggtgcg agcgtaatc 480
ggatttactg ggcgtaaagg gcgcgtaggc ggttgtgtga gtgtgatgtg aaagccccgg 540
gctcaacctg ggaagtgcac cgcaaacgac acaactggag tatatgagag ggtggcggaa 600
tttccggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tcggaaggaa cgtcgatggc gaaggcagcc 660
acctggcata atactggcgc tgaggcgcgga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc 720
ctggtagtca cgcccgtaaa cgatgagaac tagatgttg agggggaacc cttcagtatc 780
gaagctaacg cgataagttc tccgcctggg aagtacagtc gcaagactga aactcaaaag 840
aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga 900
accttacctg cccttgacat cctgcgaatc ttgccgagag gtgagagtgc cgcagggagc 960
gcagagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgagatgttg ggttaagtcc 1020
cgtaacgagc gcaacccttg tccttagttg ccatcattta gttggggact ctaaggagac 1080
cgccggtgat gaaccggagg aaggcgggga cgacgtcaag tcatcatggc ctttatgggt 1140
agggctacac acgtgctaca atggggcgta cagagggtcg ccaaccgcg agggggagcc 1200
aatctcttaa agcgtctcgt agtccggatt ggagtctgca actcgac 1247
```

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 1292

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 84

```
ggctcgcaag agcaaccggc gaacgggtgc gtaacacgtg aacaacctgc cctcgtgtgg 60
gggatagccg ggctaaccgc cgggtaatac cgcatacgtt ctctctgggg agtcttgggg 120
agaggaaagc tccggcgcac ggggaggggt tcgcggccta tcagctagtt ggcggggtaa 180
tggcccacca aggcgacgac gggtagctgg tctgagagga tggccagcca cattgggact 240
gagagacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atcttgcgca atggccgaaa 300
ggctgacgca gcgacgccgc gtgtgggagg acgcctttcg ggggtgtaaac cactgttgcc 360
```

```

cgggacgaac agcctctttc gagaggtctg acggtaccgg gtgaggaagc accgggctaac 420
tccgtgccag cagccgcggt aatacggagg gtgcgagcgt tgtccggaat cattgggcgt 480
aaagggcgcg taggtggccc ggtcagttcg tggtgaaagc gcggggctca accctgcgtc 540
ggccatgaat actgccgcgg ctggagcact gtagaggcag gcggaattcc ggggtgtagcg 600
gtggaatgcy tagagatccg gaagaacacc ggtggcgaag gcggcctgct gggcagtagc 660
tgacactgag gcgcgacagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc 720
cgtaaacgat gggcactagg cgcttggggg agcgaccccc cgagggcccg cgctaacgca 780
ttaagtgcc cgctggggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 840
cccgacaag cgggtggagca tgtggtttta ttcgacgcaa cgcgagaagc cttaccctagg 900
cttgacatac acgggaaacc ggtcagaaac ggccggccct cttcgagacc cgtgcacagg 960
tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg 1020
caaccctgt ctctagtgtc cagcgcgtca tggcggggac tctagagaga ctgccggtgc 1080
caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgg tccttacgtc tagggctaca 1140
cacgtgctac aatggcgggg acagaggggt gcgagccggc aacggcaagc caatcccgtc 1200
aaccgcgct cagttcggat tgtcgtctgc aactcgacgg catgaagctg gaatcgctag 1260
taatcgtgga tcagctacgc cacggtgaat ac

```

<210> 85

<211> 1300

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 85

```

tcccttcggg agcaagtaca gcggcgaacg ggtgagtaac acgtaggtaa cctaccctgg 60
agactgggat aacctgccga aaggcgggct aataccagat aagaccacga gggctgcggc 120
ccttggggca aaaggtggcc tctacttgta agctaccact ccgggatggg cctgcgcgcc 180
attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcagaga tggctagctg gtctgagagg 240
atggccagcc acacagggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtgggg 300
aatattgcgc aatgggcgaa agcctgacgc agcgacgccg cgtgggtgat gaaggccttc 360
gggtcgtaaa gccctgtcaa gagggacgaa accttgctga cctaacacgt cggcaacctg 420
acggtacctc tgaaggaagc accgggctaac tccgtgccag cagccgcggg aatacggagg 480
gtgcgagcgt tgttcggaat tactgggcgt aaagcgcggt taggcggcct cttcagtcgt 540
gtgtgaaagc ccggggctca accccggaag tgcattggat actgggaggc tggagtaccg 600
gagaggaggg tgggaattcct ggtgtagcgg tgaaatgctg agatatcagg aggaacacct 660
gtggcgaagg cgccctctg gacggatact gacgctgaga cgcgaaagcg tggggagcaa 720
acaggattag ataccctggg agtccacgct gtaaacgatg ggcactaggt gttcggggta 780
ttgacccctc gagtgccgca gctaacgcac taagtgcgcc gcctggggaa tacggccgca 840
aggttaaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 900
tcgacgcaac gcgaagaacc ttacctgggc tagacaacat cggacagcct cagaaatgag 960
gtctccccgc aaggggcccgg tggttcagggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg 1020
agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccctgtc tctagttgct accattcagt 1080
tgagcactct agagagactg ccnngtgta aacgggagga aggtggggac gacgtcaagt 1140
cctcatggcc cttatgtcca gggctacaca cgtgctacaa tgggcgatac aaagggctgc 1200
gaaccgcgca ggggaagcca atcccaaaaa gtcgctctca gttcggattg gagtctgcaa 1260
ctcgactcca tgaaggcgga atcgctagta atcgcggtac

```

<210> 86  
 <211> 1186  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 86  
 caatggggcag cggcgggacgg gtgagtaaca cgtggggaatg taccttttcgg tgcggaacaa 60  
 ctcaggggaaa cttgagctaa tgccgcatac gcccttacgg ggaaagattt atcgccgaaa 120  
 gatcagccccg cgttggatta gctagttggt gaggtaatgg cccaccaagg cgacgatcca 180  
 tagctgggtt gagagaacga ccagcctcac tgggactgag acacggccca gactcctacg 240  
 gaggcagca gttgggaatc ttggacaatg ggggaaaccc tgatccagcc atgccgcgtg 300  
 agtgatgaag gccttcgggt tgtaaaactc tttcgacggg gacgataatg acggtacccg 360  
 tagaagaagc tccggctaac ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg gggctagcgt 420  
 tgttcggaat tactgggcgt aaagcgtgcg caggcggcta tccaagtcag tggtgaaagc 480  
 ccggagctca actccggaat tgccattgaa actgttttagc ttgagtacga gagaggtgag 540  
 tggaataccc agtgtagagg tgaaattcgt agatattggg tagaacaccg gtggcggaagg 600  
 cggctcactg gctcgttaact gacgctcagg cacgacagcg tggggatcaa acaggattag 660  
 ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgatg aacgctagcc gttggatagc ttgctattca 720  
 gtggcgcagc taacgcatta agcgttccgc ctggggagta cggccgcaag gttgagactc 780  
 agaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gacgcaacgc 840  
 gcagaacctt accaggggtt gacatcctgt gctcgccggt gaaagccggt tttcccgcaa 900  
 gggacgcaga gacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tggtgggtta 960  
 agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgccctt agttgccatc attcagttgg gcactctaga 1020  
 gggaccgccg gcgacaagcc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcccc atggccctta 1080  
 caccctgggc tacacacgtg ctacaatggc ggtgacagtg ggcacgagct cgcgagagtc 1140  
 agctaattccc aaaaaaccgt cccagttcag attgcactct gcaact 1186

<210> 87  
 <211> 1454  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 87  
 cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga attgggccct ctagatgcat 60  
 gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatata tgcagaattc gcccttcagg cctaacacat 120  
 gcaagtcgag cgagaaaagg cgcttcggcg cctgagtaca gcggcgcacg ggtgcgtaac 180  
 acgtgggcaa tctgtccttg agatggggat aaccacgcga aagttgggct aataccgaat 240  
 aagactacag gaggcaactc ccgtgggttaa aggggtgctct ctgcggggag catgcgcttg 300  
 aggaggagcc cgcggcctat cagctagttg gtagggtcac ggccatacaa ggcgaagacg 360  
 ggtagctggt ctgagaggat gaccagccac acggggactg agacacggcc ccgactccta 420  
 cgggaggcag cagtggggaa tattgggcaa tgggggaaac cctgacccag cgacgcccg 480  
 tgggtgatga aggccttcgg gtcgtaaagc cctgtcgggc ggaacgaagg ttctcacggc 540

```

aaatagccgt gagaggtgac ggtaccgccg aaggaagcac cggccaactc cgtgccagca 600
gccgcggtaa gacggagggt gcaagcggtg ctcggaatca ctgggcgtaa aggggtgcgta 660
ggcggtctcg caagtctggc gtgaaagccc aaggctcagc cttggaagtg cgctcgaaac 720
tgcgaggctg gagtgccgga ggggagagtg gaattcccgg tgtagcggtg aaatgcgtag 780
agatcgggag gaataccggt ggcgaaagcg actctctgga cggcaactga cgctgaggca 840
cgaaagcggt gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgga 900
cactaggtgt cgggggtatc cactccctcg gtgccgccgc taacgcagta agtgtcccg 960
ctgggaagta cggtcgcaag attaaaactc aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg 1020
tggagcatgt ggttcaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctgggttt gacatctggc 1080
gaatctctgg gaaaccagag agtgcccgcg ggggagcgcc aagacagggt ctgcatggct 1140
gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttacc 1200
ttagttgccc ccgggtcaag ccgtggcact ccaagggaac tgcccgtgtt aagcgggagg 1260
aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatggc ctttatatcc agggctacac acgtgctaca 1320
atggctggga canagcgtgg ccaacgcgcg agcgggagct aatcgcaaaa cccagcctc 1380
agttcggatc ggagtctgca actcgactcc gtgaagctgg aatcgctagt aatcgcggtat 1440
cagcatgccg cgggt

```

1454

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 1307

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organime Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 88

```

cccttcgggg agcgagtaca gcggcgaacg ggtgagtaac acgtaggtaa cctaccctgg 60
tgactgggat aacttgccga aaggcgggct aataccagat aagaccacga gggctgcggc 120
ctttggggta aaagatggcc tctgcttgca tgctatcacg ccgggatggg cctgcgcgcc 180
attagctagt tggtagagta acggctcacc aaggcagaga tggctagctg gtctgagagg 240
atggccagcc aactgggac tgagacaacg cccagactcc tacgggaggg agcagtgggg 300
aatattgcgc aatgggcgaa agcctgacgc agcgacgccg cgtgggtgat gaaggccttc 360
gggtcgtaaa gccctgtcaa gagggacgaa acctcgccga cccaatacgt cggcgacctg 420
acggtacctc tgaaggaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggg aatacggagg 480
gtgcaagcgt tgttcggaat cactgggcgt aaagcgcggt taggcggcct tcttagtctg 540
gtgtgaaagc ccggggctca accccggaag agcattggat actggaaggc tggagtaccg 600
gagaggaggg tggaaattcct ggtgtagcgg tgaaatgcgt agatatcagg aggaacaccg 660
gtggcgaagg cggccctctg gacggatact gacgctgaga cgcgacagcg tggggagcaa 720
acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat ggtactaggt gttcggggta 780
ttgacccctc gagtgccgca gctaacgcac taagtacccc gcctggggac tacggccgca 840
aggctaaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 900
tcgacgcaac gcgaagaacc ttacctgggc tagacaacac tggacagccc cagaaatggg 960
gtcttcccgc aagggaactg tgggttcagg gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg 1020
agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccctgtc tctagtgtgt accattaagt 1080
tgagcactct agagagactg cccgtgttaa acgggaggaa ggtggggacg acgtcaagtc 1140
ctcatggccc ttatgtccag ggctacacac gtgctacaat ggacagtaca aagggtgcg 1200
aaccctgtag ggggagccaa tcccaaaaag ctgttctcag ttcggattgg agtctgcaac 1260
tcgactccat gaaggcggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgcc

```

1307



<210> 89  
 <211> 1305  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol.

<400> 89  
 gggagcaatc cccaagtaga gcggcgaacg ggtgagtaac gcgtgggtaa tctgcctccg 60  
 agtggggaac aacatcgga aactggtgct aataccgcat aacatcggtg ggtcttcgga 120  
 tctgacgac aaagccggg accgcaaggc ctggcgcttg gagaggagcc cgcgtccgat 180  
 tagctagtgt gtggggtaat ggcccaccaa ggcttcgatc ggtagccggc ctgagagggc 240  
 gacggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa 300  
 tttttcgcaa tgggcgaaag cctgacgaag caacgccgcg tggaggatga gggccttcg 360  
 gtcgtaaact cctgtcgacc gggacgaaag taggatggcc taatacgccg atctattgac 420  
 tgtaccggtg gaggaagcca cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagaggtg 480  
 gcaagcggtt ttcggaatta ctgggcgtaa agggcgcgta ggcggttg ttagtcccgt 540  
 gtgaaatccc tcggctcaac tgaggaactg cacgggaaac tgcttggtt gagttcgga 600  
 gaggggaagt gaattccggg tgtagcgggt aaatgcgtag atatccggag gaacaccggt 660  
 ggcgaaggcg gcttcctgga ccgacactga cgctgaggcg cgaaagctag gggagcaaac 720  
 gggattagat accccggtag tcctagctgt aaacgatgag tgctgggtgt agggggatc 780  
 aacccccct gtgccgaagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cggtcgcaag 840  
 gctgaaactc aaaggaattg acggggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggttcaattc 900  
 gacgcaacgc gaagaacctt accgggggtt gaactgtacg ggacagctct agagatagag 960  
 tcttccttcg ggaccggtac agaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1020  
 gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttgcctcct gttgccatca ggtaaagctg 1080  
 ggcactctgg agagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcct 1140  
 catggccttt atgccccggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaaa gggtcgcaaa 1200  
 accgcgaggt ggagctaata ccaaaaagcc ggtcccagtt cggattgcag tctgcaactc 1260  
 jactgcatga agttggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgcc 1305

<210> 90  
 <211> 1299  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 90  
 gggctttcgg gtcctgagta aagtggcgaa cgggtgagta acgcgtaggt aacctgacct 60  
 cgagtgtgga ataacctggc gaaagccggg ctaataccgc atgacgtctt cgggtcttcg 120  
 gacttgagga ccaaaggtgg cgagctttga gcgctgtcgc tcgagaaggg gcctgcgtcc 180  
 cattagctag ttggtggggt gatggcctac caaggcgacg atgggtagcc gggctgagag 240  
 gctgtccggc cacactggaa ccgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggt 300  
 gaatcttgcg caatggggga aacctgacg caacgacgcc gcgtgggcga tgaaggcctt 360  
 cgggtcgtaa agccctgtcg agcgggacga accgtgcgag ctctaacata gctcgtgcct 420

```

gacggtaccg ctagaggaag ccccggtctaa ctccgtgccg gcagccgcgg taatacggag 480
ggggctagcg ttattcggaa ttattgggcg taaagggcgt gtaggcggct ctgtgtgtcc 540
catgtgaaag ccctcggctc aaccggggaa ctgcatggga aactgcggag cttagtcccg 600
ggagaggtga gtggaattcc cagtgtagcg gtgaaatgcg tagatattgg gaggaacacc 660
agtggcgaa ggcggtcact ggaccggtac tgacgtgag acgcgaaagc caggggagca 720
aacgggatta gataccccg tagtcctggc tgtaaacgat gagcacttgg tgtggcgggt 780
atcgaccctt gccgtgctga agctaacgca ttaagtgtc cgcctgggga gtacggccgc 840
aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggttcaa 900
ttcgacgcaa cgcgaagaac cttacctggg tttgaactgc aggtgacagc ccctgaaagg 960
gggtcttctt tcgggacacc tgtagaggtg ccgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga 1020
gatgttggtt taagtcccg aacgagcgca acccctactc ctagtgtgcc gcggtcggc 1080
cggaactct agggggaccg ccggtgataa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc 1140
ctcatggcct ttatgtccag ggctacacac gtgctacaac ggacggtaca aagggtgcg 1200
aaggcgcgag ccggagccaa tcccaaaaag ccgttctcca gtgcggattg cagtctgcaa 1260
ctcgactgca tgaagggtga atcgctagta atcgcggt 1296

```

<210> 91

<211> 1296

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 91

```

atgtctggta gcaataccag atgatggcaa gtggcggacg ggtgagtaat acgtagggat 60
ctgcccagaa gagggggaca acccggggaa actcgggcta ataccgcata ctattctgag 120
gaagaaaagct tggcgcaagc caggcgcttt tggaggaacc tacgtccgat tagctagtgt 180
gtgaggtaaa ggctcaccaa ggcagagatc ggtagctggt ctgagaggat gaccagccac 240
actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa 300
tgggggcaac cctgatccag cgatgccgcg tgtgtgaaga aggccttcgg gttgtaaagc 360
acttttagtt gggaagaagt aatgtttttt aatagagagc attgttgacg gtacccaaag 420
aataagcacc ggctaactct gtgccagcag ccgcggtaat acagaggggtg caagcgtaa 480
tcggagttac tgggcgtaaa gggcgcgtag gcggtgttgc aagtgagatg tgaaatccct 540
gggcttaacc taggaaccgc attttagact gcaatgctag agtacagtag agggtagtgg 600
aatttcgggt gtagcgggtga aatgcgtaga gatcggaagg aacaccagtg gcgaaggcga 660
ctacctggac tgacactgac gctgaggcgc gagagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 720
ccctggtagt ccacgctgta aacgatgaga actagatgtt ggtgcgcgcg agcgcacaa 780
tatcgaagct aacgcgataa gttctccgcc tggggagtag ggccgcaagg ttaaaactca 840
aaggaattga cggggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg 900
aggaacctta cctacccttg acatccacag aatttgatag agatatcgaa gtgccgaaag 960
gaactgtgag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gttgtgagat gttgggttaa 1020
gtcccgtaac gagcgcaacc cttatcctta gttgccaaac cgtaatggtg gggactctaa 1080
ggagactgcc ggtgaagaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac catggccttt 1140
atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ggcgtacaga gggttgccaa cctgcgaagg 1200
ggagccaatc ccggaaagcg cctcgtagtc cagattgaag tctgcaactc gacttcatga 1260
agtcggaatc gctagtaatc gcgaatcaga acgtcc 1296

```

<210> 92  
 <211> 1250  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 92  
 gtctggtagc aataccagat gatggcaagt ggcggacggg tgagtaatac gtagggatct 60  
 gccagaaga gggggacaac ccggggaaac tcgggctaata accgcatact attctgagga 120  
 aaaaagcttg gcgcaagcca ggcgcttttg gaggaaccta cgtccgatta gctagttggt 180  
 gaggtaaagg ctcaccaagg cagagatcgg tagctggtct gagaggatga ccagccacac 240  
 tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg 300  
 ggggcaaccc tgatccagcg atgccgcgtg tgtgaagaag gccttcgggt tgtaaagcac 360  
 tttagttggg gaagaagtaa tgttttttaa tagagagcat tgttgacggt acccaaagaa 420  
 taagcaccgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtataac agaggggtgca agcgttaatc 480  
 ggagttactg ggcgtaaaagg gcgcgtaggc ggtggtgcaa gtgagatgtg aaatccctgg 540  
 gcttaaccta ggaaccgcat tttagactgc aatgctagag tacagtagag ggtagtgga 600  
 tttccggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tcggaaggaa caccagtggc gaaggcgact 660  
 acctggactg aactgacgc tgaggcgcga gagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 720  
 ctggtagtcc acgctgtaaa cgatgagaac tagatgttgg tgcgcgcgag cgcacaagta 780  
 tcgaagctaa cgcgataagt tctccgcctg gggagtagcg ccgcaagggt aaaactcaaa 840  
 ggaattgacg ggggcccgcga caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgat gcaacgcgaa 900  
 gaaccttacc tacccttgac atccacagaa tttgatagag atatcgaagt gccgaaagga 960  
 actgtgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt tgtgagatgt tgggttaagt 1020  
 cccgtaacgg gcgcaaccct tatccttagt tgccaacacg taatggtggg gactctaagg 1080  
 agactgccgg tgaagaaccg gaggaagggt gggacgacgt caagtcatca tggcctttat 1140  
 gggtagggct acacacgtgc tacaatgggg cgtacagagg gttgccaacc tgcgaagggg 1200  
 agccaatccc ggaaagcgcc tcgtagtcca gattgaagtc tgcaactcga 1250

<210> 93  
 <211> 1545  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 93  
 ccaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcttggtg cagagctcgg atccactagt 60  
 aacggccgcc agtggtgctgg aattcgccct tcaggcctaa cacatgcaag tcgaacggca 120  
 gcacagggga gcttgctccc tgggtggcga gtggcggacg ggtgaggaat acatcggaat 180  
 ctgcccagtc gtgggggata acctcgggaa accgggacta ataccgcata cgaccttagg 240  
 gtgaaagcgg aggaccgcaa ggcttcgcgc gattggatga gccgatgtcg gattagcttg 300  
 ttggcggggt aacggcccac caaggcgacg atccgtagct ggtctgagag gatgatcagc 360  
 cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggt gaatattgga 420  
 caatgggcgc aagcctgatc cagccatgcc gcgtgagtga agaaggcctt cgggttgtaa 480  
 agctcttttg tccggaaaga aaagctttcg gttaataccc ggaagtcctg acggtaccgg 540

```

aagaataagc accggctaac ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg gtgcaagcgt 600
tactcggaat tactgggcgt aaagcgtgcg taggtggttt gttaagtctg atgtgaaagc 660
cctgggctca acctgggaat tgcactggat actggcaggg tagagtgcgg tagaggatgg 720
cggaattccc ggtgtagcag tgaaatgcgt agagatcggg aggaacatct gtggcgaagg 780
cggccatctg gaccagcact gacactgagg cacgaaagcg tggggagcaa acaggattag 840
ataccctggt agtccacgcc ctaaacgatg cgaactggat gttgggagca actaggctct 900
cagtatcgaa gctaacgcgt taagttcgcc gcctggggag tacggtcgca agactgaaac 960
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagtat gtggtttaat tcgatgcaac 1020
gcgaagaacc ttacctggcc ttgacatcca cggaacttac cagagatggg ttggtgcctt 1080
cggnaaccgt gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1140
taagtcccg c aacgagcgca acccttgtcc ttagttgcca gcacgtaatg gtgggaactc 1200
taaggagact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatggcc 1260
cttacggcca gggctacaca cgtactacaa tggtcggtac agagggttgc aaagccgcga 1320
ggtagagcca atcccagaaa accgatccca gtccggatcg aagtctgcaa ctcgacttcg 1380
tgaagtcgga atcgctagta atcgcgatc agaatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1440
ttgtacacac cgcccaaggg cgaattctgc agatatccat cacactggcg gccgctcgag 1500
catgcatcta gagggcccaa ttcgcctat agtgagtcgt attac 1545

```

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 1549

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 94

```

ttttaaacgg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggccctct 60
agatgcatgc tcgagcggcc gccagtgtga tggatatctg cagaattcgc ccttcaggcc 120
taacacatgc aagtcgagcg gcagcgcggg gcaacctggc ggcgagcggc ggacgggtga 180
ggaatgcacg ggaatctacc ctgtcgtggg ggataacgta gggaaactta cgctaatacc 240
gcatacgacc gagaggtgaa agtgggggac cgcaaggcct cacgcgatag gatgagccga 300
tgccggatta gctagttggg gaggtaaagg ctcaccaagg cgacgatccg tagctggtct 360
gagaggatga tcagccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 420
gtggggaata ttggacaatg ggcgcaagcc tgatccagcc atgccgcgtg tgtgaagaag 480
gccttcgggt tgtaaagcac ttttgttcgg gaagaaatcg tgcgggttaa taccagtagc 540
ggatgacggg accgaaagaa taagcaccgg ctaacttcgt gccagcagcc gcggtaatat 600
gaagggtgca agcgttactc ggaatcactg ggcgtaaagc gtgcgtaggc ggttggttaa 660
gtctgctgtg aaagccctgg gctcaacctg ggaactgcag tggatactgg ccagctagag 720
tgtgatagag gatggtggaa ttcccggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tcgggaggaa 780
caccagtggc gaaggcggcc atctggatca acactgacgc tgaggcacga aagcgtgggg 840
agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa cgatgcgaac tggacgttgg 900
gagcaacttg gctctcagtg tcgaagctaa cgcgctaagt tcgccgcctg gggagtacgg 960
tcgcaagact gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcg caagcgggtg agtatgtggg 1020
ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atccacggaa cttaccagag 1080
atggtttggg gccttcggaa ccgtgagaca ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc 1140
gtgagatgtt gggtttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtccttagtt gccagcacgt 1200
aatggtggga actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaagggtg ggatgacgtc 1260
aagtcatcat ggcccttacg gccagggcta cacacgtact acaatggtcg gtacaagagg 1320

```

gttgcaaagc ccgcgaggta gagccaatcc cagaaaaccc gatcccagtc ccggatcgaa 1380  
gtctgcaact cgacttcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag aatgccgcgg 1440  
tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccaagggcg aattccagca cactggcggc 1500  
cgttactagt ggatccgagc tcggtaccaa gcttggcgta atcatggtc 1549

<210> 95

<211> 1276

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 95

gtggcggcga gcggcggacg ggtgaggaat acatcggaat ctaccagtc gtgggggata 60  
acgtagggaa acttacgcta ataccgcata cgacctgagg gtgaaagcag gggatcgcaa 120  
gaccttgccg gattggatga gccgatgtcc gattagctag ttggtgaggt aaaggctcac 180  
caaggcgacg atcggtagct ggtctgagag ggtgatcagc cacactggaa ctgagacacg 240  
gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgga caatgggcgc aagcctgatc 300  
cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggcctt cgggttgtaa agcacttttg ttcgggaaga 360  
aatcttccga gttaataacct cgggaggatg acggtaccgg aagaataagc accggctaac 420  
ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg gtgcaagcgt tactcggaat tactgggcgt 480  
aaagcgtgcg taggtggttc gttaagtctg ccgtgaaagc cccgggctca acctgggaat 540  
tgcggtggat actggcggac tagagtgcgg tagaggggtg tggaattccc ggtgtagcag 600  
tgaaatgcgt agagatcggg aggaacatct gtggcgaagc ggccacctgg accagcactg 660  
acactgaggc acgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccc 720  
taaacgatgc gaactggacg ttgggagcaa ctaggtctct agtgtcgaag ctaacgcgtt 780  
aagttcgcg cctggggagt acggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggccc 840  
cgcacaagcg gtggagtgtg tggtttaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctggcct 900  
tgacatccac ggaatccttt agagatagag gagtgccttc gggaaccgtg agacaggtgc 960  
tgcatggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccga acgagcgcaa 1020  
cccttgctct tagttgccag cgcgtaatgg cgggaactct aaggagactg ccggtgacaa 1080  
accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc atcatggccc ttacggccag ggctacacac 1140  
gtactacaat ggtggggaca gagggtcgcg aagccgcgag gtggagccaa tcccagaaac 1200  
cccatcctag tccggatcgg agtctgcaac tcgactccgt gaagtcggaa tcgctagtaa 1260  
tcgcggtcag catgcc 1276

<210> 96

<211> 1306

<212> ADN

<213> Organisme Inconnu

<220>

<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 96

cagggatcag tagagtggca aacgggtgag taacgcgtgg gcgacctacc ttcgagtggg 60  
ggataacctt ccgaaaggag ggctaatacc gcatgacatc ccgtgttttg atacacggac 120

```

atcaaagccg gggatcgcaa gacctggcgc ttggagaggg gcccgcgccc gattagctag 180
ttggtgaggt cacggctcac caaggctccg atcggtatcc ggccctgagag ggccggacgga 240
cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaattgttcg 300
caatgggccc aagcctgacg acgcaacgcc gcgtggagga tgaagacctt cgggtcgtaa 360
actcctttcg accgagatga agaccggccg gcctaatacg ccggcggatt gacagtatcg 420
agggagaag ccccggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg taatacgggg ggggcaagcg 480
ttgttcggaa ttactgggcg taaagggttc gtagggtggct cgctaagtca gacgtgaaat 540
ccctcagctc aactggggaa ctgcgtctga gactggcaag cttgagtgcg ggagagggaac 600
gcggaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagatatctg gaggaacacc ggtggcggaag 660
gcggcggttc ggactgcaac tgacactgag gaacgaaagc taggggagca aacgggatta 720
gataccccgg tagtcctagc cctaaacgat gaatgcttgg tgtggcgggt atcgatccct 780
gccgtgccgc agttaacgcg ataagcattc cgcctgggga gtacggtcgc aaggctgaaa 840
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggttcaa ttcgacgcaa 900
cgcaagaac cttacctagg ctgcaagtgc agatgaccat cggtgaaagc cgactttcgc 960
aagaacatct gtagaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1020
aagtcccgcg acgagcgcaa cccttggttc ctggtgccat caggtaagc tgggcactct 1080
ggagagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc agcatggcct 1140
ttatgtctag ggctacacac gtgctacaat ggccggtaca aagcgctgca aaccgcgag 1200
ggtgagccaa tcgcagaaag ccggtctcag ttcggatagc aggtgcaac tcgcctgctt 1260
gaagttggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaat 1306

```

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 1300

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organime Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 97

```

cccgccagggt gagtagatgg caaacgggtg agtaaacacgt ggggtgacctg cctcagagtg 60
ggggataacg acccgaaagg gtgcgtaata ccgcataaca tcctgtcttt ggatagacgg 120
agatcaaagc cggggatcgc aagacctggc gcttagagag gggcccgcgg ccgattagct 180
agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa cgatcgggat ccggcctgag agggcggacg 240
gacacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaattgtt 300
cgcaatgggc gcaagcctga cgacgcaacg ccgcgtggag gatgaagatc ttcgggtcgt 360
aaactccttt cgatcgggaa gaacgcctct ggtgtgaaca ccatcagagg gtgacggtag 420
cgagagaaga agccccggct aactctgtgc cagcagccgc ggtaatacag ggggggcaag 480
cgttgttcgg aattactggg cgtaaagggc tcgtaggcgg ccggctaagt ccgacgtgaa 540
atccccaggc ttaacctggg aactgcgtcg gatactggcg ggcttgaatc cgggagaggg 600
atgcggaatt ccaggtgtag cggtgaaatg cgtagatatc tggaggaaca ccggtggcga 660
aggcggcatc ctggaccggt attgacgctg aatagcgaag gccaggggag caaacgggat 720
tagatacccc ggtagtcttg gccctaaacg atgaatgttt ggtgtggcgg gtatcgatcc 780
ctgccgtgcc gaagctaacg cattaaacat tccgcctggg gagtacggtc gcaaggctga 840
aactcaaagg aattgacggg ggccgcgaca agcgggtggag catgtgggtc aattcgacgc 900
aacgcgaaga accttaccga ggctcgaaac gcattggaca tccggcgaaa gccggctccc 960
gcaagggccg atgtcgaggt gctgcatggc tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg 1020
ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgct cgctgttgcc atcacgttat ggtgggcact 1080
ctgcggagac tgccggtgat aaaccggagg aagggtgggga tgacgtcaag tcagcatggc 1140

```

```

ctttatgtct ggggctacac acgtgctaca atggccggta caaaccggtg cgatctcgca 1200
agagtgaagt aatcggagaa agccggtctc agttcggatt gcaggctgca actcgcctgc 1260
atgaagttgg aatcgcctagt aatcgcggat cagcacgccg 1300

```

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 1233

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 98

```

cgagcgcc agacgggaga gtaacacgtg ggaacgtgcc ctttggttcg gaacaacaca 60
gggaaacttg tgctaatacc ggataagccc ttacggggaa agatttatcg ccaaaggatc 120
ggcccgctc tgattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatcagtagc 180
tggtctgaga ggatgatcag cctcactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 240
gcagcagtgg ggaatattgg acaatgggag caagcctgat ccagccatgc cgcgtggatg 300
atgaaggccc tagggttgta aagtccttcc ggcggggaag ataatgacgg taccgcgaga 360
agaagccccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggttaata cgaagggggc tagcgttgct 420
cggaatcact gggcngtaaa gcgcacgtag gcggcttttt aagtcagggg tgaaatcctg 480
gagctcaact ccagaactgc ctttgatact gagaagcttg agtccgggag aggtgagtgg 540
aactgcgagt gtagagggtga aattcgtaga tattcgcaag aacaccagtg gcgaaggcgg 600
ctcactggcc cggtactgac gctgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 660
ccctggtagt ccacgctgta aacgatggat gctagccgtt gtcgggttta ctcgtcagtg 720
gcgcagctaa cgcattaagc atcccgcctg gggagtacgg tcgcaagatt aaaactcaaa 780
ggaattgacg ggggcccgcg caagcgggtg agcatgtggg tcaattcgaa gcaacgcgca 840
gaaccttacc agcccttgac atgtcccgtg tgagtaccag agatggaact cttcagttcg 900
gctggcgagg acacaggtgc tgcattggct tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 960
aagtcctgca acgagcgcaa cctcgcctct tagttgccat catttagttg ggcactctaa 1020
ggggactgcc ggtgataagc cgcgaggaag gtggggatga cgtcaagtc tcatggccct 1080
cacgggctgg gctacacacg tgctacaatg gcggtgacag tgggatgcag aggggtaacc 1140
ccgagcaaat ctcaaaaagc cgtctcagtt cggattgtgc tctgcaactc gagcacatga 1200
agttggaatc gctagtaatc gcagatcagc acg 1233

```

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 1304

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 99

```

cgaaatcccg cagggatcag tagagtggca aacgggtgag taacacgtgg gtgacctgcc 60
ttcgagtggg ggataacgtc ccgaaaggga cgctaatacc gcatgacatc ctgctcttga 120
acgagtggag atcaaagctg gggatcgcaa gacctagcgc tcaaagaggg gcccgcgctt 180
gattagctag ttggtggggg aacggctcac caaggcgacg atcagtatcc ggctgagag 240

```

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| ggcggacgga | cacactggga | ctgagacacg | gcccagactc | ctacgggagg  | cagcagtggg | 300  |
| gaattgttcg | caatgggagc | aagcctgacg | acgcaacgcc | gcgtggagga  | tgaagatctt | 360  |
| cgggtcgtaa | actcctttcg | atcgagacga | acggcctccg | ggtgaacaat  | ccggaggagt | 420  |
| gacggtaccg | agagaagaag | ccccggctaa | ctccgtgcca | gcagccgcgg  | taatacgggg | 480  |
| ggggcaagcg | ttgttcggaa | ttactgggcg | taaagggtc  | gtaggcggcc  | aactaagtca | 540  |
| gacgtgaaat | ccctcggctt | aaccggggaa | ctgcgtctga | tactggatgg  | ctagaggttg | 600  |
| ggagagggat | gcggaattcc | aggtgtagcg | gtgaaatgcg | tagatatctg  | gaggaacacc | 660  |
| ggtggcgaa  | gcggcatcct | ggaccaattc | tgacgctgag | gagcgaaagc  | caggggagca | 720  |
| aacgggatta | gataccccgg | tagtcctggc | cctaaacgat | gaatgcttgg  | tgtggcggtt | 780  |
| atcgatccct | gccgtgccga | agctaacgca | ttaagcattc | cgcctgggga  | gtacggtcgc | 840  |
| aaggctgaaa | ctcaaaggaa | ttgacggggg | ccgcacaaag | cggtaggagca | tgtggttcaa | 900  |
| ttcgacgcaa | cgcgaagaac | cttaccacgg | cttgaacagc | gagtgaccac  | tcctgaaaag | 960  |
| gagcttccgc | aaggacactc | gtagaggtgc | tgcatggctg | tcgtcagctc  | gtgtcgtgag | 1020 |
| atgttgggtt | aagtcccgcg | acgagcgcaa | cccttggttg | ctgttgccat  | cacgttatgg | 1080 |
| tgggcactct | gcaaagactg | ccggtgataa | accggaggaa | ggtggggatg  | acgtcaagtc | 1140 |
| agcatggcct | ttatgtctgg | ggctacacac | gtgctacaat | ggccggtaca  | aaccgtcgca | 1200 |
| aaaccgtaag | gtcgagctaa | tcggagaaag | ccggtctcag | ttcggtatcg  | cggctgcaac | 1260 |
| tcgccggcgt | gaagttggaa | tcgctagtaa | tcgcggatca | gcac        |            | 1304 |

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 1197

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organisme Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 100

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| tctagtggcg | cacgggtgcg | taacgcgtgg | gaatctgccc | ttgggttcgg  | gataacagtt | 60   |
| ggaaacgact | gctaataccg | gatgatgtct | tcggaccaaa | gatttatcgc  | ccagggatga | 120  |
| gcccgcgtcg | gattagctag | ttggtgaggt | aaaggctcac | caaggcgacg  | atccgtagct | 180  |
| ggtctgagag | gatgatcagc | cacactggga | ctgagacacg | gcccagactc  | ctacgggagg | 240  |
| cagcagtggg | gaatattgga | caatgggcga | aagcctgatc | cagcaatgcc  | gcgtgagtga | 300  |
| tgaaggcctt | agggttgtaa | agctcttttg | cccgggatga | taatgacagt  | accgggagaa | 360  |
| taagccccgg | ctaactccgt | gccagcagcc | gcggtataac | ggagggggct  | agcgttggtc | 420  |
| ggaattactg | ggcgtaaagc | gcacgtaggc | ggctttgtaa | gttagaggtg  | aaagccccga | 480  |
| gctcaactcc | ggaactgcct | ttaagactgc | atcgcttgaa | cgtcggagag  | gtaagtggaa | 540  |
| ttccgagtgt | agaggtgaaa | ttcgtagata | ttcggaagaa | caccagtggc  | gaaggcgact | 600  |
| tactggacga | ctgttgacgc | tgaggtgcga | aagcgtgggg | agcaaacagg  | attagatacc | 660  |
| ctggtagtcc | acgcgtaaaa | cgatgatgac | tagctgtcgg | ggctcatgga  | gtttcgggtg | 720  |
| cgcagctaac | gcgttaagtc | atccgcctgg | ggagtacggc | cgcaaggtta  | aaactcaaag | 780  |
| aaattgacgg | gggcctgcac | aagcgggtga | gcatgtgggt | taattcgaag  | caacgcgcag | 840  |
| aaccttacca | gcgtttgaca | tggtaggacg | gtttccagag | atggattcct  | tcctttacgg | 900  |
| gacctacaca | caggtgctgc | atggctgtcg | tcagctcgtg | tcgtgagatg  | ttgggttaag | 960  |
| tcccgcaacg | agcgcaaccc | tcgtctttag | ttgctaccat | ttagttgggc  | actctaaaga | 1020 |
| aactgccggt | gataagccgg | aggaaggtgg | ggatgacgtc | aagtccctcat | ggcccttacg | 1080 |
| cgctgggcta | cacacgtgct | acaatggcgg | tgacagtggg | cagcaaactc  | gcgagagtga | 1140 |
| gcaaatcccc | aaaaaccgtc | tcagttcggg | ttgttctctg | caactcgaga  | gcatgaa    | 1197 |



<210> 101  
 <211> 1352  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 101  
 cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga attggggccct ctagatgcat 60  
 gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatatc tgcagaattc gcccttcagg cctaacacat 120  
 gcaagtcgca cgagaaaggg cttcggcccc ggtacagtgg cgcacgggtg agtaacacgt 180  
 aggcaatctc ccctcgagtgt gtggataaacc ttccgaaagg agggctaata cagcatgaga 240  
 gcacgagctc gcagagcttg tggccaaagc ggacctcttc ttgaaagttc gcgcttgagg 300  
 atgagcctgc ggcccatcag ctagtttgta gggtaatggc ctaccaaggc taagacgggt 360  
 agctgggtctg agaggacgga cagccacact ggaactgaga cacgggtccag actcctacgg 420  
 gaggcagcag tggggaatct tgcgcaatgg acgaaagtct gacgcagcga cgccgcgtga 480  
 gcgatgaagg ccttcgggtt gtaaagctct gtggggagag acgaataagg tgcagctaat 540  
 acctgcatcg atgacgggtat ctcccttagca agcaccggct aactctgtgc cagcagccgc 600  
 ggtaagacag aggggtgcaaa cggtgttcgg aattactggg cgtaaagcgc gtgtaggcgg 660  
 ctgtgtaagt cgggcgtgaa atcccatggc tcaaccatgg aagtgcaccc gaaactgcgt 720  
 agctagagtc ctggagagga aggtggaatg cttggtgtag aggtgaaatt cgtagatatc 780  
 aagcgggaaca ccggtggcga agcggccttc tggacagtga ctgacgctga gacgcgaaag 840  
 cgtgggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaatgctag 900  
 acgctgggggt gcatgcactt cgggtgtcgc gctaacgcac taagcattcc gcctggggag 960  
 tacggccgca aggttaaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat 1020  
 gtgggtttaat tcgaagcaac gcgcaaaccct taccaaccct tgacatgtcc attgccggtc 1080  
 cgagagattg gaccttcagt tcggctggat ggaacacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag 1140  
 ctcggtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctac cgccagttgc 1200  
 catcattcag ttgggcactc tgggtggaact gccggtgaca agccggagga agcggggatg 1260  
 acgtcaagtc ctcatggccc ttatgggttg ggctacacac gtgctacaat ggcggtgaca 1320  
 gtgggacgcg aagtccaaga tggacaaatc cc 1352

<210> 102  
 <211> 1361  
 <212> ADN  
 <213> Organisme Inconnu

<220>  
 <223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 102  
 aacagctatg accatgatta cgccaagctt ggtaccgagc tcggatccac tagtaacggc 60  
 cgccagtgtg ctggaattcg cccttcaggc ctaacacatg caagtcgaac ggatcccttcg 120  
 ggattagtgg cggacgggtg agtaacacgt gggaacgtgc cctttgggtc ggaacaactc 180  
 agggaaactt gagctaatac cggataagcc ttctgagggg aagatttatc gccattggag 240  
 cggccccgct aggattagct agttggtgag gtaaaagctc accaaggcga cgatcccttag 300  
 ctgggtctgag aggatgatca gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tcctacggga 360

```

ggcagcagtg  gggaatcttg  cgcaatgggc  gcaagcctga  tccagccatg  ccgcgtgagt  420
gatgaaggcc  ttaggggtgt  aaagctcttt  caccggagaa  gataatgacg  gtatccggag  480
aagaagcccc  ggctaacttc  gtgccagcag  ccgcggtaat  acgaaggggg  ctagcgttgt  540
tcggaattac  tgggcgtaaa  gcgcacgtag  gcggatattt  aagtcagggg  tgaaatccca  600
gagctcaact  ctggaactgc  ctttgatact  gggatatctt  agtatggaag  aggtaagtgg  660
aattccgagt  gtagaggtga  aattcgtaga  tattcggagg  aacaccagtg  gcgaaggcgg  720
cttactggtc  cattactgac  gctgaggtgc  gaaagcgtgg  ggagcaaaca  ggattagata  780
ccctggtagt  ccacgccgta  aacgatgaat  gttagccgtc  gggcagtata  ctgttcgggt  840
gcgcagctaa  cgcattaaac  attccgcctg  gggagtacgg  tcgcaagatt  aaaactcaaa  900
ggaattgacg  ggggcccgcg  caagcgggtg  agcatgtggt  ttaattcgaa  gcaacgcgca  960
gaaccttacc  agctcttgac  attcgggggt  tgggcagtgg  agacattgtc  cttcagttag  1020
gctggcccca  gaacaggtgc  tgcattggct  tcgtcagctc  gtgtcgtgag  atgttgggtt  1080
aagtcccgcg  acgagcgcaa  ccctcgccct  tagttgccag  catttagttg  ggcactctaa  1140
ggggactgcc  ggtgataagc  cgagaggaag  gtggggatga  cgtcaagtcc  tcatggccct  1200
tacgggctgg  gctacacacg  tgctacaatg  gtggtgacag  tgggcagcga  gacagcgatg  1260
tcgagctaat  ctccaaaagc  catctcagtt  cggattgcat  ctgcaactcg  agtgcataaa  1320
gttggaatcg  ctagtaatcg  cagatcagca  tgctgcggtg  a  1361

```

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 1300

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organime Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 103

```

catgttttagt  agcaatacta  aatgatgacg  agcggcggac  ggggtaggaa  cacgtaggaa  60
cctgcccgaag  agagggggac  aaccaaggga  aactttggct  aataccgcat  aatctctacg  120
gagaaaagtt  gcccgttaag  gtggcgcttt  tggagggggc  tgcgtccgat  tagttagtgt  180
gtgaggtaat  agctcaccaa  gactgtgata  ggtaactggt  ctgagaggag  gaccagtcac  240
actgggactg  agacacggcc  cagactccta  cgggaggcag  cagtggggaa  tcttggacaa  300
tgggggcaac  cctgatccag  cgatgcccg  tgggtgaaga  aggccttcg  gttgtaaagc  360
cctttaggcg  ggggaagaag  atatgggatg  aataagcctg  tattttgacg  gtaccgcgag  420
aataagcacc  ggcaaactct  gtgccagcag  ccgcggtaat  acagagggtg  cgagcgtaaa  480
tcggattttac  tgggcgtaaa  gggcgcgtag  gcggttgtgt  gagtgtgatg  tgaaagcccc  540
gggctcaacc  tgggaagtgc  atcgcaaacg  acacaactgg  agtatatgag  aggggtggcg  600
aatttcgggt  gtacgggtga  aatgcgtaga  gatcgggaag  aacgtcgatg  gcgaaggcag  660
ccacctggca  taatactgac  gctgaggcgc  gaaagcgtgg  ggagcgaaca  ggattagata  720
ccctggtagt  ccacgccgta  aacgatgaga  actagatgtt  ggagggggaa  cccttcagta  780
tcgaagctaa  cgcgataagt  tctccgcctg  ggaagtacag  tcgcaagact  gaaactcaaa  840
agaattgacg  ggggcccgcg  caagcgggtg  agcatgtggt  ttaattcgat  gcaacgcgaa  900
gaaccttacc  tacccttgac  atcctgcgaa  tcttgccgag  aggtgagagt  gccgcaagg  960
gcgcagagac  aggtgctgca  tggtctgctg  cagctcgtgt  tgtgagatgt  tgggttaagt  1020
cccgtaacga  gcgcaaccct  tgtccttagt  tgccatcatt  tagttgggga  ctctaaggag  1080
accgccggtg  atgaaccgga  ggaaggcggg  gacgacgtca  agtcatcatg  gcctttatgg  1140
gtagggttac  acacgtgcta  caatggggcg  tacagagggt  cgccaacccg  cgagggggag  1200
ccaatctctt  aaagcgtctc  gtagtccgga  ttggagtctg  caactcgact  ccatgaagtc  1260
ggaatcgcta  gtaatcgcg  atcagcagtg  ccgcggtgaa  1300

```

<210> 104  
<211> 1250  
<212> ADN  
<213> Organisme Inconnu

<220>  
<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 104  
tgttagcaata catcagtggc agacgggtga gtaacacgtg ggaaccttcc tcgtttgtacg 60  
ggacaactca gggaaacttg agctaatacc gtatacgtcc gagaggagaa agatttatcg 120  
caatgagacg ggcccgcgtc ggattagcta gttggtaagg taacggctta ccaaggcgac 180  
tatccgtagc tgatctgaga ggatgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact 240  
ctacgggag gcagcagtgg ggaatcttgg acaatggcg caagcctgat ccagccatgc 300  
cgcgtagtg aagaaggcct tagggttgta aagctctttt gccagggacg ataatgacgg 360  
tacctgagaa taagccccgg caaacttcgt gccagcagcc gcggtataac gaagggggct 420  
agcgttgctt ggatttactg ggcgtaaagc gcacgtaggc gggtcggtta gtcaggggtg 480  
aaatccccga gctcaactcc ggaactgcct ttgatactgg cgaccttgag gctggaagag 540  
gttagtgga ttcccagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttgggaagaa caccagtggc 600  
gaaggcggct aactgggtcca gatctgacgc tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 660  
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa ctatgggtgc tagctgtcag cgggcttgct 720  
cgttgggtggc gcagctaacc cattaagcac cccgcctggg gtagtacggtc gcaagattaa 780  
aacttaaagg aattgacggg ggcccgacac agcgggtggag catgtgggtt aattcgaagc 840  
aacgcgcaga accttaccaa cccttgacat cccgatcgcg gacaccagag atggagtcct 900  
tcagttcggc tggatcggag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 960  
gttggggttaa gtcccgaac gagcgcaacc ctgcgcttta gttgccatca tttagtggg 1020  
cactctaaag ggactgccgg tgataagccg gaggaagggtg gggatgacgt caagtccctca 1080  
tgggcccttac ggggtgggct acacacgtgc tacaatggcg gtgacaatgg gcagctactt 1140  
cgcaaggaga agctaattcc aaaaagccgt ctgagttcag attgcactct gcaactcggg 1200  
tgcatagaat tggaatcgct agtaatcgct aatcagcagg tagcgggtgaa 1250

<210> 105  
<211> 1302  
<212> ADN  
<213> Organisme Inconnu

<220>  
<223> Origine de la séquence :Organisme du sol

<400> 105  
ggcttcggct ccccggtaga gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa tctgcctttg 60  
ggtggggaat aacccttcga aagaggggct aataccgcat aacgcagcgg caccgaatgg 120  
tgacagttgt taaagtgggg gatcgcaaga cctcacgcct gaagaggagc ccgcgcccga 180  
ttagctagtt ggtgcggtaa tggcgtaacca aggcggcgat cggtagccgg cctgagaggg 240  
cggacggcca cactggcact gagagacggg ccagactcct acgggaggca gcagtgggga 300  
atthtgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgcgc gtgaaggacg aaatccctct 360  
gggatgtaaa cttcgaaagt tggggaagaa atccgtgtga ggataatgca cacgggatga 420

|            |            |            |            |             |             |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| cggtacccaa | cgtaagcccc | ggctaactac | gtgccagcag | ccgcggtaat  | acgtaggggg  | 480  |
| caagcggtgt | tcggaattac | tgggcgtaaa | gggcgcgtag | gcggtacgac  | aagtctggag  | 540  |
| tgaaagcccg | gggctcaacc | ccggaatgtc | tttggaact  | gtcgaacttg  | agtgcggaag  | 600  |
| aggcatctgg | aattcccagt | gtagcggtag | aatgcgtaga | tattgggaag  | aacacctgag  | 660  |
| gcgaaggcgg | gatgctgggc | cgacactgac | gctgaggcgc | gaaagccagg  | ggagcgaacg  | 720  |
| ggattagata | ccccggtagt | cctggcccta | aacgatggat | acttgggtgtg | tgggggttctc | 780  |
| gaagtccccg | cgtgccggag | ctaacgcggt | aagtatcccc | cctggggagt  | acggtcgcaa  | 840  |
| ggctgaaact | caaaggaatt | gacggggacc | cgcacaagcg | gtggagcatg  | tgggttcaatt | 900  |
| cgacgcaacg | cgaagaacct | tacctgggtt | aaatcctacc | tcgtcgctc   | agagatgagg  | 960  |
| tttcccttcg | ggggaggtag | gacggtgctg | catggctgtc | gtcagctcgt  | gccgtgaggt  | 1020 |
| gttgggttaa | gtcccgcac  | gagcgcaacc | cttaccacta | gttgccagcg  | gttcggccgg  | 1080 |
| gcactctatt | gggactgccg | gtgacaaacc | ggaggaaggt | ggggatgacg  | tcaagtcac   | 1140 |
| atggccttta | tgtccagggc | tacacacgtg | ctacaatggc | cgaacaaaag  | cgcagcaaac  | 1200 |
| ccgcgagggg | gagccaatcg | caaaaatccg | gtctcagttc | ggattggagt  | ctgcaactcg  | 1260 |
| actccatgaa | gttggaatcg | ctagtaatcg | cggatcagca | tg          |             | 1302 |

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 1281

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Organime Inconnu

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Origine de la séquence :Organisme du sol

&lt;400&gt; 106

|             |             |             |              |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|------|
| tgcttctctt  | gagagcggcg  | gacgggtgag  | taatgcctag   | gaatctgcct  | ggtagtgggg  | 60   |
| gataacgttc  | ggaaacggac  | gctaataccg  | catacgtcct   | acgggagaaa  | gcaggggacc  | 120  |
| ttcgggcctt  | gcgctatcag  | atgagcctag  | gtcggattag   | ctagttggtg  | aggtaatggc  | 180  |
| tcaccaaggc  | gacgatccgt  | aactggtctg  | agaggatgat   | cagtcacact  | ggaactgaga  | 240  |
| cacgggtccag | actcctacgg  | gaggcagcag  | tggggaatat   | tggacaatgg  | gcgaaagcct  | 300  |
| gatccagcca  | tgccgcgtgt  | gtgaagaagg  | tcttcggatt   | gtaaagcact  | ttaagttgga  | 360  |
| aggaagggca  | gtaaattaat  | actttgctgt  | tttgacgtta   | ccgacagaat  | aagcaccggc  | 420  |
| taactctgtg  | ccagcagccg  | cggtaataca  | gaggggtgcaa  | gcgttaatcg  | gaattactgg  | 480  |
| gcgtaaagcg  | cgcgtaggtg  | gtttgttaag  | ttggatgtga   | aatccccggg  | ctcaacctgg  | 540  |
| gaactgcatt  | caaaactgac  | tgactagagt  | atggtagagg   | gtggtggaat  | ttcctgtgta  | 600  |
| gcggtgaaat  | gcgtagatat  | aggaaggaa   | accagtggcg   | aaggcgacca  | cctggactaa  | 660  |
| tactgacact  | gaggtgcgaa  | agcgtgggga  | gcaaacagga   | ttagataccc  | tggtagtcca  | 720  |
| cgccgtaaac  | gatgtcaact  | agccgttgga  | agccttgagc   | ttttagtggc  | gcagctaacg  | 780  |
| cattaagttg  | accgcctggg  | gagtacggcc  | gcaagggttaa  | aactcaaagt  | aattgagggg  | 840  |
| ggcccgcaca  | agcgggtggag | catgtggttt  | aattcgaagc   | aacgcgaaga  | accttaccag  | 900  |
| gccttgacat  | ccaatgaact  | ttctagagat  | agattggtgc   | cttcgggaac  | attgagacag  | 960  |
| gtgctgcatg  | gctgtcgtca  | gctcgtgtcg  | tgagatgttg   | ggttaagtcc  | cgtaacgagc  | 1020 |
| gcaacccttg  | tccttagtta  | ccagcacgac  | atgggtgggca  | ctctaaggag  | actgccgggtg | 1080 |
| acaaaccgga  | ggaaggtggg  | gatgacgtca  | agtcacatcatg | gccttacgg   | cctggggtac  | 1140 |
| acacgtgcta  | caatgggtcgg | tacagagggg  | tgccaagccg   | cgagggtggag | ctaattccac  | 1200 |
| aaaaccgatc  | gtagtccgga  | tcgcagtcgtg | caactcgact   | gcgtgaagtc  | ggaatcgcta  | 1260 |
| gtaatcgcca  | atcagaaatg  | t           |              |             |             | 1281 |

<210> 107  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 107  
cgctgcagat ttaaataatgc aacgcgtaag tcgatggcgt tcg 43

<210> 108  
<211> 51  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 108  
cgggtcaactt aattaagata tctcgagaga tctattaata cgatacctgc g 51

<210> 109  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 109  
aaaaagatat ctgacgtccc gaaggcgtg 29

<210> 110  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 110  
aaaaaagatc tggctaacta actaaaccga ga 32

<210> 111  
<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 111

gtgccggttaa ttaagctccg cgaagtcgct cttctt

36

<210> 112

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 112

gtgccggttaa ttaaccgctg cataaccctg cttcgg

36

<210> 113

<211> 42717

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:cosmide  
a26gl brin non codant

<400> 113

```
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaacc gggccctgac 60
gttcagaact ccccgcgaga atctctcggc agagcgccctg cacctcgact tcaccggcag 120
tgtcgagatc gatgcaggtg caagcgaact cgggatgctc ggccgcgatg gtacgtccca 180
gacccacac cgggtgcccgc gcgggcacca ccggcatctg cagatgctcc gcatgaacgc 240
ccgccgtaat cagccagatt cgcggatgct gcgattcggc gtcggacgct tgtttcgtca 300
gctgtatgcg tcccactccg aattcttgaa cgatgcgcaa aatgtcttcg caggcgggtc 360
ccccgcgagc cgacggatcg gtctcctcct cgggtctcatc caggctcccc cagtgaatga 420
cgccccggta aggctgatcc ggtatctcgg catcgcgacc cgaaatcaca accgtgtttg 480
tgcccagccc tcgcgccacc gcggetgcga tgccgccgga atcggcaatg accagccatg 540
caccgcacac cgttgccggt ggactctcgg ccagcagctg cggctcccat tccatagcgt 600
ggaaccattc ggattggcgc tccagttcct gggcacgcag gccttggaac tcgaggatga 660
cgtggccttc cgcacacac aggggtgacat cgccctcgag ccgccccgtc agccgcgcgt 720
gcaccctaag atcgccggcg ggtctgccga aacagtgcaa ccgttcgatg gcgacaggca 780
cgcaaggacc ggcgctgcct tcgccgccaa gcgtcgcgcc cagcacctgc aaacaggcat 840
cgagcaaggc aggatgaagc gtgtaaccgg actctgcttc gcgaacggca tccggcacgc 900
tcagtgcgcg cactgcctcg ccgtcgcgcc gccacacttc cgcgatgccg cggaagggtg 960
cgccgtaatg catcccctgc gatgcgaagg ccgcatagaa gtcacgccc tcgatgcgat 1020
ccccaagtgt gggcaggctc accgtgggcg cgaccttgct cggcgccgca gccatgggtg 1080
```

cgcgcgcggtg ctccggtccaa tcggaaccgc cttcggccag actggagatg cggaatgcgt 1140  
gtccctcgag tatgacctgc actcgcgagg cgcccgcgga aggaacaacc agcatttgtt 1200  
caaaccggat ctcttccagg ctgcagccac ccgcgaacac ttccttggct gcggccagcg 1260  
ccatctccac ataagcggca ccgggaagca ccacaagctc gttgagccgg tgatcggcga 1320  
gaaacggcag cgcattccaga gagagcacgg actcccagac gtgtgtgtcc ggccgagcg 1380  
caatctcgac cttgcgaccg agcagcggat gaccgccaac tgccggcaaa cttcgccgcg 1440  
tcgaggtcgc gaaccagaag cgctcgcgct gccagggata cgtcggcaga tccaggcgcg 1500  
tgtcgggaga cgaagcgagc gcgcgccagt ccggacgctg cccattcacg tagagcgcg 1560  
cgagcaactc gagcagctca cgccgctccg gttcgtcgcg gcgcagtagc gggcgaaacca 1620  
gtccgtttat gccgagcgct cgcagactat cctcgatcga cggcgctcagc acaggatgcg 1680  
gactgatctc caggaactgc gtgaactcat caccagccat cgctgcaac gactcccaga 1740  
aacggactgg ctgtcgcaga ttggctaccc agtacgagc gtcgcacgcc tcgcccgtgc 1800  
tcaactgtcc ttcaaccgtg gagaagaacg gcacggcgga acgttttgca ataacgcggc 1860  
cgagttcctg gcgcaattcg ttctcgagcg ggtccacctg cgagctgtgt gaagcgacat 1920  
ccacctgaat cagccggcag aagacgcccg gcctctcgaa gtcgtccttc aaatgctcga 1980  
jagccacacg gtctcccag aacaccgtgc tgcgtggctc gttgctggcc gcgacagaaa 2040  
cagtagtgag accgcgttca gcgagcacgg ccttcgcccg atcgagcggc agttcgacca 2100  
gagccatcgc tcccgggccc cgaagtccga gcaacagccg gctgcggcga cagatgatgc 2160  
gggcccgcgc ctccagggtg agaatgcctg cgacatgggc cgcgcgact tctcccatgc 2220  
tgtgtccggc cagccgctcc gggcgaaatc cccaggattg cagcagttcg accagcgcg 2280  
tttgaacggc gaacagcgca ggctgcacgc gatcgatctg gtcagccat gctcccact 2340  
cgtcggcgag caggtccgca agccgccatt ccacgaagct gcggaaggcg gcgtcgcaac 2400  
gttcgatcgc cgatcggaag acaggctcgt cggaaatacag gcgatacgcc atgcgcgggt 2460  
actgtccgcc ctggccggaa aagatgaagg cgagtttcgg acgaactccg ggatcggcga 2520  
aacgggtggc gacgccgcga ttggtttcat tgcgccgaa ggctcgagc aattgattga 2580  
actcggcgag ggatgaggcc acaaacgctg cgcgatgttc gtagtgactg cgcgtcaggc 2640  
tggcggcgga acacagcgcg gagagcggag cgtgaaagcg cccatcgcg taggcgccgg 2700  
cgagatcgcg cagagcctgc ggatggcgcg ccgaaagcgg taggaggtat tcgcgccgt 2760  
cttcggcatg gattgatcc gggaccggca cttcctcgcg gctgggcggc cggcccagac 2820  
ccccgcgcgc gcttcgcggg cggtgtccc cctcgaggag ggggacacta gcactagcct 2880  
tagcctccac attccctttg gcctctacac tcgcttgac ctcttcactc gtcttcgct 2940  
ctacattcgt cttcgccctc acattcgtct tcgcttctac attcgtcttc gcttctgcga 3000  
jgacgacgtg cgaattgggt ccactgattc cgaacgagct caccgccgga actcgggggc 3060  
ggccgttggg gggccatggc gaacatgcgg tggctatctt tagcggcagc tcattccaga 3120  
gtacgtgcgg gttgggcgcg ttgaaatgca gatggggcgg aatctctcgg tgctgcagg 3180  
cgagaatggt cttgatcagg ccggcgatac ctgccgcgcg ctccagggtg ccgaagtgg 3240  
ttttcaccga cccgacgatc aacggagaat cgacggcacg cccctcgccc agcaccgctg 3300  
ccatcgcccg cagttcgatg ggatctccca gcggcgctcc ggttcggtgg gcttccacgt 3360  
aatcgacatc ggcgggggcc atgcggcgct tcttgagcgc cgcgcgaatc acggcttct 3420  
gcgcgggacc gttcggcgcc gtgaggcgt tgcgtcgcc gccgtggtg acggccgatc 3480  
cgcaatcag cgccagaata cgatcgccgt cagcgctgc atcgacagc cgcttcagca 3540  
ccagcattcc gcatccctcg ccgcggccgt aaccgtcggc ggaggcagcg aaacttttgc 3600  
aacggccatc ggccgccatg gcccgcaggc ggcagaagta gatcgtgct tccggcgcca 3660  
gaatcaggtt cagccgcgcg gccagcgcca tgctgcactc tcgcgactgc aagctgcggc 3720  
acgccagatg aaccgccacg agtgagggaag agcacgcgt gtcgacgggg aagttcggtc 3780  
cctgcaacc cagcagatag gagatccgtc cggcgccagt gctgaacgcg gttccggtac 3840  
cggtataggc gtcaatgagc gccggatcgg taggtttcag ccggctgtag tcgtcggtgc 3900  
tgatcccgat gaacactccg gtgtcgctgc ccgcgagact gtcggggcggc cgaccgcac 3960  
gctccaaagc ttcccatgcc acctcgagca gcaggcgctg ctgcggatcc agaccggcga 4020  
cctcgcgcg cgtagattcc aagaagccgg cgtcgaagcc gtcgacggca ccatcgagga 4080

atccgcccag acgcgtgtac atctttcccg gcgcgttggg atcgggatcg taaaacgcat 4140  
cgccatccca acggcccgcg ggaatttcgc ggatggcatc gatgccatcg tgcaggagct 4200  
gccaaaatgc ttccggcgag tccgcgcgcg gaaagcggca agccatgccg acgatcgcga 4260  
tggttctcgt gtggacgctc tccagttcgt cgagacgcgc tcgcgtgcgc ttgagcgcca 4320  
ggaccgcctg ttgaagagga gtgagatcgc tcacgttcc tctcccagat ggtgcaagg 4380  
ttccgtgatg aacgcgcgca tctcctgctc ggacagctgc cgcacttcat cgacgaggga 4440  
atcgctgggg acgtcagatc cgagttcgcg gaggacatgg ccggccaatt tctcgacggt 4500  
cggatggtcg tatagcaatg tcgcgggaag gctcttgccg accagctctc cgatggcgcg 4560  
cgccagatcc agcgcctatc gcgaatcgag tccgtattcc ttgagcggcc ggcgcgggtc 4620  
gagcgtcttg gacgcacgca gcgccagcac gccgcggcc tgcctgcgga tgcgcacctg 4680  
cagcagttcc tgccgcgct ccggcgcgagc ttcggtgagt tgcctggatga agccgggatc 4740  
gctcgcgggg ctccgccttt ttcggcgga gacttggaa accgcgatct gagcggcagt 4800  
ctcgcggcagc agatcgccga agatgcgcgc accacttcc ggcggcagca gcggtacccc 4860  
cgccaggcct tgccgcgcga tgcgcgcggc catgccttcg ccgcccattg gtccccaatt 4920  
gatgctcagc gccggtagtc cttgcgcgcg gcgcagtgtg gcaaggctgt cgagaaatgc 4980  
gttggccgcc gagtaattgc tctgtccggc ggaaccgagc agcgaagcgg cggaagagaa 5040  
gagtacgaaa aagtcgagcg catggtggcg agtgagctgg tgaagattcc aggcaccctg 5100  
cagcttcggc gccagcacct tctcgaaacg agcccacgtc tgttctgtaa ctaccccgctc 5160  
atcgagcacg cctgcggcat gcacgactcc acgcagcggc tgggtgcgcg ggtccgccag 5220  
cagcgcggcc agctgttgct cggaactcac atcgcaagca gcaaccatga ctgcagcccc 5280  
gagttgctcg agatcggcaa ctgcctccgt atgccggccg accagtacca gacggcgcg 5340  
gccttgctcg atcaagcggc gtgccaccct tcgtccta at gcgcgagac cgccggtgat 5400  
cagatagacg ccgtcggctg aaatggcagg cggccgcttc gacgtttcct tgtgccgcac 5460  
cagccggcga acgtagcggc gtccgttgcg caatgcgatc gctttgtcgt cgccggcata 5520  
acggatttca tccagcagca tggcggcggc gatgtcggca ttgtcgcaac cgaggtcgat 5580  
caggccgccc cacagctcgg gatgctcgcg cgcgatcgcc tgcccagatc ccacagtg 5640  
agcctggaaa ggatcgacgg gagtcgcac gtcatcactg atcgatgca cgccgcgcgt 5700  
gatcagccag agccgcgcgg ggcggccgac caaagtctgg gtctgttcca gcgcctggcg 5760  
gagagtgaag ccggacacga cgcgcagctc ttgcggcatc aaaccggcga catcgtctgc 5820  
gccggcacac agcaaccagt cctccggctt gccaggggcg tcggacttca acgttgtcga 5880  
tcgctcgcac tctgccact gcacatcctg cagccacgac tgtgcggatt gcagcgtacc 5940  
ggcatgcatt acagccagtc cggaaaaactc ggcgatgacc gcgcgggtct cttcaaccag 6000  
cgtcagatca ccgacgaacg ggccgctcga gctcggggcg agacgcgcac gacagcgag 6060  
agaacctgcc ggcggacggt agaagcgcac cgcttcgatc ccgaccggca cgtatgcgcc 6120  
gggttgcaaa cgctccgcgg gccaaagtgc tccgaatact tgaaaacaag aatcgatcag 6180  
gccgggggtgc agccggtaag cgttcgcgcc atcctcagcc accggcagac gcattcgccc 6240  
cagcgcctcg ccacgcgac gccagacttc tccacccaa ctgaaggcgg ggccaagatc 6300  
gacgccgcgt gcgttcacgc cgccgtagaa cgcacgcgg gaaatgactt cggaaggctg 6360  
cgccggcagc tcgaaatgaa cggcgccggc agtcgcgcgg cgacagactg ctgccgtgtg 6420  
gagcttccac gaatcgccat cctggctgaa gacctgcacc tttgcttcgc cgtcctcgcc 6480  
gggtgtgaca atcgcttgca ccgtgaccgg cgtatccggc gggatggcca gtgcctgccg 6540  
catcatgaca tcggagacgg cgcagggaac cggaccgaag acttcctgtg ccgcttcgag 6600  
aaatgccgac acgtgccagg cgccgggcac aatgaccgcg tcgtagatca cgtgctcatg 6660  
gagcagaggg gtctccgtgg ttagcgaatt ttcgaagatg acatcgccca acgcgtgtt 6720  
gaggcgcgct cccaacatgc cgccgcgcgc cggctctctc gcgggtacgc gtctcaggct 6780  
gaaggtgtca cgctgaaacg gatacgtcgg cagcgcgacg cggctgggtg attccccggc 6840  
atagagaccg cgccagtcgg gattcacgcc cgcggtaaac agccagaccg cgccgtcatc 6900  
cagcagggac caatccgatc gtcccttaga tagggagtgc agccagaccg cgccgtcatc 6960  
gggcagacaa tatcgcccca gcgtggtgag cgtgggatgc gggccgattt ccagaaacag 7020  
cttgcaactcg cgggtccgcca ggggttcgcat cgcgctttca aactgcacgg tttcgcgcaa 7080



|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| ctgtcgccgc  | cagtagcggg  | cgtcgagtgt  | cgtgcctttc  | ggcaatacgg  | ctccgctgac  | 7140  |
| gttcgacacc  | agcgggatcg  | ccagcggctg  | atacgcgatc  | gcacctgcaa  | gcgcttcgaa  | 7200  |
| cttgtccaaa  | atcggatcca  | tcagcggcga  | atggaacgca  | tgcgatacgt  | tcagctctcg  | 7260  |
| cgtttccacg  | ccggcgcgat  | gcaggtcatc  | ttgcgcttcc  | gcgatttctg  | cagccgtgcc  | 7320  |
| ggagatcacg  | gtgcgggtccg | gcgcattcga  | tgcggcgact  | gccaccttgg  | cggcgagcgc  | 7380  |
| cgcgatgcgg  | ctcggatttg  | cgtgaacgat  | gaccgctttg  | ccgcggggaa  | gcgcattgac  | 7440  |
| cagccgcccc  | ctggcggtca  | ccagccgcag  | gccgtcctcc  | acgctaaagg  | cgccggccac  | 7500  |
| acacgccgca  | acatactcgc  | cgagactgtg  | gcccagcacg  | tagtccggcc  | ggacgccgag  | 7560  |
| cgacagccag  | aactgagcca  | gagcccatte  | cagggcaaac  | attgccggct  | gggtatacgc  | 7620  |
| cgtctcgtgc  | aacggcgaaa  | ccgactcgaa  | caagagaacg  | gtcagcggaa  | catcgagctg  | 7680  |
| gggacggagc  | caatcggcgc  | aacgatcgag  | cgcgtcgcga  | aaaacaggct  | gcgttttata  | 7740  |
| aagctctgcy  | cccatgccgg  | cgtactgcgc  | gccctggccg  | gtgaagagaa  | aagcgattgc  | 7800  |
| cggccgcccg  | cgcaacgata  | cttcgcgcgc  | cggcgccgcg  | gccaatgccg  | ctacagcctc  | 7860  |
| tgcgcgatct  | gcggcggtga  | tcgccaagcg  | gtgactatat  | gcgtcgcgcc  | caacctgact  | 7920  |
| agtgaagcaa  | acgtcggaca  | gcaacgcatt  | cgggtgcgac  | tgcaggaact  | ccgcgaagtg  | 7980  |
| tcggccagct  | tcgcccagcg  | cttcgtcggt  | gcgcgccgac  | agagtgagaa  | gctgcggggc  | 8040  |
| tgtgaccggc  | ttcggcaaaag | ggagtgcagg  | cgcctcttcg  | aggatgacgt  | gcgcgttgct  | 8100  |
| ccctccaaaa  | ccgaacgagc  | tgacgcgggc  | cagacgcggc  | cgtccttccg  | acgtccacgg  | 8160  |
| cgacgattcc  | gtggcgatgc  | gaaaccggct  | gccgtccagt  | gagatgttcg  | gattcagccg  | 8220  |
| gcgaaaatgc  | aggtgcggag  | gaatggtgcg  | atgctgcagg  | gcgagtacgg  | ctttgatcag  | 8280  |
| cccggcgatt  | cccgcgcgcg  | cctccagatg  | cccgatgttg  | gtctttacgg  | aaccagcag   | 8340  |
| acaaggcgca  | gagtcggcg   | cgtcgtagac  | cgactgcagg  | gcctcgatct  | cgataggatc  | 8400  |
| gcccagcgac  | gtgcccgtgc  | catgcgcctc  | gatcaacgat  | acgtgggatg  | gacgatgtg   | 8460  |
| cgcgttgggc  | accgcctctt  | gcaggaccgc  | cttctgcgcc  | tgcagattcg  | gcgccgtgat  | 8520  |
| gccattgctc  | cgtccgtcct  | gattgattgc  | cgagccgcgg  | atgactgcac  | ggatggcatc  | 8580  |
| gccatcggcc  | agcgcacatcg | agagccgctt  | cagcagcacg  | atgccgcagc  | cctcgcgcgc  | 8640  |
| cacataaccg  | tcggctgcgg  | cgtcgaacgt  | cttgcagcgt  | ccgtcggggc  | ccaacatgcy  | 8700  |
| agccttcgac  | aaagcgatca  | tgccctcggg  | agtcaggatc  | aagttcactc  | cgccggcgaa  | 8760  |
| tgcgcgatcg  | cattcgcgcgc | ggcgagggct  | ttggcaagcc  | agatggacgg  | cgacgagcgc  | 8820  |
| ggaggagcag  | gccgtatcga  | ccgccatgct  | cggaccgcgc  | aggtcgagca  | gataggagat  | 8880  |
| gcgattggcc  | aacatgctat  | gcgccacgcc  | ggaacccgac  | caagctccga  | tgcgggcagg  | 8940  |
| gtcggcgctac | tgaaacagtc  | cgaagtccctg | ggcgagggag  | ccggcaaaga  | cgccggtcgc  | 9000  |
| gtgcccggc   | agagggccgg  | gagagatgcc  | ggcgtcctct  | gccgcttccc  | agcacacttc  | 9060  |
| cagcagcagc  | cgtgctgctg  | gatccatggt  | cagagcttcg  | cggggggaga  | tgccgaagaa  | 9120  |
| ttccgcgatc  | aaaccgtcaa  | tgcgttcgag  | gaaggcggca  | tatcgcgcac  | acgccttgcc  | 9180  |
| cggagcatcg  | ggatcggagg  | agtagtactg  | gtccgagttc  | cagcgggtctg | gcggcacctc  | 9240  |
| ggtgacaccg  | tcgacaccgt  | tcttcaacag  | cgtccagaag  | gcgtccggat  | tcttcgcgcc  | 9300  |
| gcccggaaaa  | cgacacgcca  | tgccgacgat  | ggcgatgggt  | tcggcggtgaa | ccaggtcgaa  | 9360  |
| gcctgcgatg  | ttttgccgca  | tgttcgcgcg  | caatagcgcg  | agtttgaccg  | acgacatggg  | 9420  |
| cgcaattttt  | tccttcacga  | ccttgtcctc  | cggagcgcag  | ccacggctgc  | ttcttccgac  | 9480  |
| atgtcgtcca  | accgcgtgag  | tgcagttttc  | atggcgcggc  | tgtctccttc  | cgcagcagcc  | 9540  |
| gcggcctgcg  | cttcgaccag  | cggcagtcct  | atcttgcgacg | ccaggtgcgg  | ggcaagaccg  | 9600  |
| gccagcgtgg  | gatgacccca  | aatcagggtc  | gcggggagcg  | tgagaccacg  | tgtgagttcg  | 9660  |
| agacggttgc  | gaaactccag  | ggccatgagg  | gaatcgaagc  | cgagttcctt  | cagcgggcgc  | 9720  |
| aggggatcga  | tagtttgaga  | gtcgatgcgc  | agcacgcgcg  | ccagctgctg  | ctgtagatgt  | 9780  |
| tcttcgagca  | atgtcctgcy  | ggtctgaggc  | tcggccgatt  | gcagccgcgc  | gcgcaacgcg  | 9840  |
| tttgggcgcat | cggcttcgct  | cgcgcgctcg  | tcatgcaaaa  | gctcgaacag  | tgcagactgc  | 9900  |
| gccgccttgg  | gatagaactg  | ccgccactgg  | cggacattga  | tgggcatcgc  | ggcgacgtgg  | 9960  |
| caagccgagc  | tgttcagcag  | ctgttccaga  | atagcgaggc  | cgtgttgcyg  | cgtcaggttt  | 10020 |
| tccatgccgc  | gcaaagccag  | ccgcgatccg  | cgattgtcct  | gcgcggcagc  | cagcccagacc | 10080 |

|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| tccgaccacg  | caccccaacc  | gatgctcagc  | gccggcaggc  | cttgggcctt  | cggtagtag   | 10140 |
| gccagcgcg   | caagaaaggc  | gttcgcggcc  | gcgtagtttc  | cctgggcggg  | cgcgccacgc  | 10200 |
| agtcctgcag  | cggaggagaa  | gagcacgaaa  | tgatcgagcg  | ggcagtcgcg  | ggtgagcaag  | 10260 |
| tgcaggttcc  | aggcaccgtc  | gatttttcgcg | gccatcacgt  | tgcggaaatg  | cgcttccgtc  | 10320 |
| tggttcagta  | gcagcgcac   | gtcgagaacg  | gctgcggcat  | gaatcacgcc  | gcgcaatcga  | 10380 |
| tcgatggaag  | agatcacgcg  | ctcgagttca  | tgcgcgtgag  | aaacatcgcc  | ctgcaccgtc  | 10440 |
| cggacatctg  | cgtccatgac  | ggcgatggct  | tgctggacct  | cgggtgaagg  | cgcgcggcgg  | 10500 |
| ctcagcagca  | ccagccgccc  | ggcgccgcgt  | ccgatcatcc  | agcgtgcgac  | ggtgaagaccg | 10560 |
| agcccgccaa  | gtccgcgggt  | aatcaagtag  | gttccctcgc  | tatcgaacgc  | cgagcgtagg  | 10620 |
| ggtgcgatgg  | gcgcattggc  | gcaatctcgc  | atcgccatga  | cgattttgcc  | gatgtgccgc  | 10680 |
| gcctgcgcca  | tggcgcgaaa  | cgctccacc   | gattcggtga  | tggtcgtcac  | tgcggtttcc  | 10740 |
| aggggcccgc  | aggtttccga  | ttcgaatttt  | gcgacctct   | cctgcagcag  | ctcccgggtc  | 10800 |
| aatgccgggc  | gcttcaggga  | catgccgagc  | aaatcgacca  | gcgtgtacga  | gaggttcttc  | 10860 |
| aggaacgggc  | gaagccccag  | cttgcggccg  | gcatagtaat  | cgcgcttgcc  | gatctcgatg  | 10920 |
| aaccgtccat  | gatcgcgag   | cagatcgaa   | ctcgccctca  | gcagatcgcc  | ggaaagcgaa  | 10980 |
| ttcaggacga  | cgtctactcc  | ttcttgattc  | gtccaattgc  | ggatgtcgtc  | cacgaaagcc  | 11040 |
| atcgagcgcg  | aatccgaaac  | atgcgcgatg  | cccagcgagc  | gcagatacgc  | tcgtttttcc  | 11100 |
| ggactcccgg  | cagtagcgaa  | gatctccgcg  | cccgcacgct  | gtgcgatctg  | gattgccgcc  | 11160 |
| aatcccacac  | cgccgggtggc | agcgtgaatc  | aggactcggt  | cgcggggcgc  | cagccgcgcc  | 11220 |
| gctcgcgaga  | gcgcgtaatc  | ggcggtgaga  | aacgcgatag  | gcagggcggc  | ggcctgttcg  | 11280 |
| gcgggaatgt  | tggccgggctt | caaggcaacg  | cgggaaggcg  | gcgtggtgac  | gaagcgaccg  | 11340 |
| aaactgcaag  | gcgcaagggc  | cacgacttca  | tctccgatgc  | gaaagtcggt  | gacgcctttc  | 11400 |
| cccatggcca  | cgatacggcc  | cgagcattcg  | ccgcccaggc  | gcgggctgcc  | ggcaatcgcg  | 11460 |
| ccgggcgcat  | cgtcgggcat  | aacgccgagg  | gcgagcagaa  | cgtcgaggaa  | gttcaggccc  | 11520 |
| gcggcgcgaga | cttcaatctc  | cacttcaccg  | gcttgcgggg  | ggcgcgcgga  | tgtggccccg  | 11580 |
| aagcgcagcc  | ggtcgaggac  | tccgggggca  | tcgatctcga  | gccggaacgg  | ccgatcgccg  | 11640 |
| gccttgaaca  | tggcgggttg  | catatccgct  | tcgtgcgcag  | ccacgcgcgc  | gacgtaacgc  | 11700 |
| gcgccgcgcg  | gaaaggcgat  | ttgattctcg  | ccgttggttcg | tcagcagttc  | gtgcaggagt  | 11760 |
| tcctcttcgc  | cgccggcggg  | atcgagatcg  | atcagcgtgc  | agttcagttc  | cggatgttcg  | 11820 |
| taatgcacgg  | tccggcccaa  | accccagaaa  | ggcgccctgag | cgataccggc  | ttgcaggatc  | 11880 |
| tgtccatcga  | ccggctgcgc  | gccgcgcgtg  | accagccata  | ggcgcggtgc  | ttgacgccag  | 11940 |
| ggcgtgcgcc  | ccagggtctg  | gaggagatgc  | agaatgcggt  | cgcatgaggg  | ttcgtgctcg  | 12000 |
| agcaaaaaca  | cgatttcctc  | gagcggcggc  | tggagttcat  | cgagcttttc  | cggcgagggtc | 12060 |
| tgcgtcacgc  | ggttgccggt  | agcgcgcagc  | catgcggtga  | gcgcgctatc  | cacagcgccg  | 12120 |
| acaatgagcc  | atgaccgcgc  | cgtcgcgcgc  | gccggcggtc  | ctgcagcggc  | gtgcggctga  | 12180 |
| gcgacccagc  | gcagttcgtg  | caaccagccg  | cgcgtgtcga  | tgcgtccga   | cgcatccagg  | 12240 |
| cgtgcagcc   | gcagaccctc  | gatgcgggcg  | accagttgtc  | cctctccgtc  | cagcagcgac  | 12300 |
| agatcggcga  | taggtccttc  | cagccgcgca  | tgcgtccaca  | ccacggaacg  | tgcgggatgc  | 12360 |
| agccagcgca  | tccggctgat  | gccggcgggc  | agccaggttc  | caccggcggg  | accaaacgcc  | 12420 |
| gcggcgatga  | tctgcagaca  | tgcacgcagg  | aacgccggcg  | cagtggaaacg | cgtttccgag  | 12480 |
| ctacgcagac  | gcccgatcgc  | ctcacctgga  | caactccaga  | tctgctcgag  | cgcgcggaaa  | 12540 |
| gccggacat   | actcgacgcc  | gtgctccgcc  | atctgacgcc  | acagctccgc  | cgcgggcacc  | 12600 |
| actgtggggc  | agcgggcctg  | caccgtctcc  | gcagaatccg  | gcgggacggt  | cgatgcaccc  | 12660 |
| gcaggcgctc  | gacgaatgtc  | cccgggaagca | tgcaggaccc  | atgtcgatgc  | ctgcgggctg  | 12720 |
| gaaatccgaa  | acgacgccat  | cccgggtcta  | tgcaccgcga  | tggccagctg  | caacgtcatg  | 12780 |
| ctgccgtcgc  | gcggcacaat  | gagcatctgt  | gtgaaagtca  | catgctccag  | cacgcacgga  | 12840 |
| ctttcaccga  | aggtctcgga  | agttccggcc  | agagccatat  | cgagatacgc  | agtagccggc  | 12900 |
| aagacgactt  | cgccctgcac  | gcgatgggtc  | gccagccaag  | gcacggaagc  | gagactgagt  | 12960 |
| tccgtctccc  | agaagaaagt  | gccggggtgc  | gtcgaggctt  | cgacgcgttt  | tcccaacagc  | 13020 |
| ggattgccca  | acgtgatcgc  | gtgtcgcgcg  | ggggaagcgt  | cgagccagaa  | acgacgacgc  | 13080 |

tgccagggat accggggcag ggcacgcaa ttgccggaag ggtacacggt ccgcatgcg 13140  
acagtgtgcc cagcctcata gagggcgccc agcgacgtga gcatggaacc gcgttcgtcc 13200  
tggtcgcggc gcagagacgg aaccagcgcc gcattgccgc cgatggcggg cagcaggatg 13260  
ggatgagggc tgatctcgag aaagacatcg tgcccgtgt cggaagatg gcggatgcc 13320  
tgccagaaca gaaccggcga tcgcagattg cgagcccagt acgtgctgtc gaggctggtg 13380  
gtctccagcg tcgcgcgggt caccgtggag taaaaaggta tggtcgcggg ccgcggttga 13440  
atcccgtcga gcgactgcag gagttcgtcg cacaatgggt ccacttgcgg gctatgcgcg 13500  
gcgaagtcca ctttcaccgg ccggcaagac acgcctcgcc gctccagcgt cgcgacgacc 13560  
tcggccaggg cttcgacttc accggagatg acggtggagt tgggtccgtt cgacaccgcg 13620  
ggcgatagtc gttccgtgta agtcgacagc acggcctcac attccgcgag cggcagctcc 13680  
accatcgcca tccgcgccag gccgtgatc cggctcaaca gccggctgcg gctgcaaagt 13740  
atccgcgcgc catcctgcag cgtcagcgca cccgcgacat gagcggcggc gacctctccc 13800  
atgctgtgcc cgatgacggc atccggctcg attccccagg aacgccacaa tgcggcgatg 13860  
gcgacctgca gcgcgaagag cgcaggctga atgacctga cgcggtcgag cttcgccagt 13920  
tcttctttca gcgaccagtc cacataaggc cgcattggcg cctcgcagcg ttccaacgcc 13980  
cgcgaaataa cgggttcgcg gtccatccag ctgcgcccc ttcgatcca ttgcgatccc 14040  
tgtcccgaga agacgaatac cgtcttccgt cgctgggaag ggatcgtgat cccctggagc 14100  
tgcgccgcca gttcttcagc cgttctgcgc gaaacagcga gccggcatcg gtgatgcgtg 14160  
cggcggactg cggcgtgta gcaaagatca cgcaggctcg gtgctgcga cgtgtcagc 14220  
aattccccgt atgcccgcgc caccgcagc agttcgtccg caccatgcgc ggacagcgga 14280  
agcacataca tcgctctgc aatgcccgt gttgccgcag tgctgcagt ccctgcaatg 14340  
tcgggagtgt ctgcagtgtc gggagtgtc gcagtgtcgg gagtgcctgc aatgtcggga 14400  
gtgccccagc tgtccccctc cgcgaggggg acagccgccc gcgcagcggc ggcgggggggt 14460  
cgggaatgga acccgctcgc agcttcgcct ctaccagtcg gcgcgcgttc ttcaagaacg 14520  
acatgcgcgt tcgtgccgga ccaaccaaac gcgctgacgc ccgcaaactc tcgtctcgaa 14580  
ccgcggggcc acggccggac ttcttccaca atgtcgagcg acgttccctc caaccggata 14640  
ttcgggttca gctgtctcac gtgtaagctc ggcggtatcg tctcgtgact caatgcgagc 14700  
accgctttaa tcaatccgc tatgcctgcc gctccctcca ggtggccgat gttcgatttc 14760  
agggacccga ccgcgcacac atcgccgaca ggtcgcggga ggccgacggg ttccgccagc 14820  
gcctcgatct cgatgggatc gccgagcgga gtccccgtgc catgggcttc gatgtaaccg 14880  
atctgctgcg ccgcgacgcc cgcattggcc aatgccgacc ggatgacgac ctgctgagac 14940  
acgacattgg gagcggtag cccggccgag cggccatcct gattgacgc ggagccgcgc 15000  
ccacggccc acaccgggtc tccggccgcg agtgcacgc acaggcgtt cagcaccacc 15060  
acgccgcagc cttctccgaa cagatgccg tccgcccgcg cgtcgaaggc gcggcagcga 15120  
ccgctggggc aggcgggttc catcttcgag gtggcgta taaactcgg cgagaagcgc 15180  
agattcactc cgcggccac ggccagcgta cactcgcgc tgccgaggct ctggcagccc 15240  
agatgaaccg ccgcagcga agacgagcag gccgtgtcga gcgcgatgct gggctccttc 15300  
aagttcagca aataggaaag tcggccggcg atcacgctat gcgcgtgcc ggtggcggtg 15360  
tacggatcga tgcgcgccc atcggcggtc tgcattcaga aatagtcgct gctttggctg 15420  
tggtatccga cgaagacgcc cgtgcggctg ccggagagcc cttccatcgt ctgccccgca 15480  
tctccagtg cctccacgc cacttccaac agcagccgct gctgcggatc aatgctgacg 15540  
gcctcgcgtg gcgaaatgcc gaaaaaatcg ttgtcgaaac catcgatgga atcgagaaat 15600  
ccggcttgaa tcttcaccgg cgtggcgggg ttcaacgatt tcaggatgcg ccggaccgac 15660  
tctcgtccc atcgtccagg cgtacctca cgaatagcat cgactccact gcgcaacatc 15720  
tgccagaact catcgggccc atcgccgccc ggaaaccggc agcccagacc cacgatcgcg 15780  
atgggttcgc gcgcgtcgcg ttcggccgca tcgagacgtc gctgcattgt ctcagcgtc 15840  
aggtacgcct gctgcaacgg cgtaagggtg gggaaatcgt cggatatcga actcactcgg 15900  
aggctcctga aaaatgagcg aacttctgt tcaacaaagc ttcgatttct ttgtcccca 15960  
acccggcgat ctggtttgcg acggcgtcga gatcgtctgc agcggcggga ctccggtcct 16020  
cgcccgcggc ggtgccaacg gtagcaagg tagcaacggc agcaacggtc gaagggtcag 16080

|             |             |             |             |            |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| cattgccggc  | catgctttcc  | agcggcaggg  | cgagcttgtc  | ggcgagatgc | tgcgccaggg  | 16140 |
| cggagaatgt  | cgggtaacgc  | cagatcaggg  | tggcagaaag  | cttgacgcgc | agcccggctt  | 16200 |
| ccagacgggt  | gcgaaactcg  | agggccatca  | acgaatcgaa  | tccgagatca | cccagcgctc  | 16260 |
| ctctgccgtc  | gagtttcgct  | ggatcgaagc  | gcagcacgtg  | tccggcttcg | tgcatacagca | 16320 |
| gcggtttccag | ccgcgcgcgg  | cgctgccgcc  | cggctggaac  | tgccaggagc | tcgctgcgca  | 16380 |
| tgtcggccgc  | cgggtttggtg | tccgcggccg  | cgggtgcgat  | gccggccagc | agggacatcg  | 16440 |
| atgcggccga  | cggatagtaa  | cggagccact  | gcgcgatatc  | gaagttcacg | acagcgacgt  | 16500 |
| gcgggccgaat | ctgcgtcaat  | gctttgtaga  | gcgcgcgcaa  | tccctgttgc | ggttgaataa  | 16560 |
| ccgagatgcc  | gcgcgcggcc  | agacgggtctc | cgcgggttcgc | ctgtgcggcc | aaaccaacct  | 16620 |
| gtgtccacgg  | tccccacgcg  | atgctgacgg  | cgggaagacc  | ctgggcgcgg | cgcagatgag  | 16680 |
| ccagcgcgtc  | gagaaatgaa  | ttgccggcgg  | cgtagttgcc  | ctggccggga | gatcccactg  | 16740 |
| tcgcgtggc   | ggaagagaag  | agaacaaaat  | gatccagcgg  | ccggccggcg | gtgagttcgt  | 16800 |
| gcaggttcca  | cgccgcggct  | actttcggag  | ccatggcggc  | ttcgaagcgt | tcggtcgtga  | 16860 |
| gattgagcag  | catgccgtcg  | gccagcgtgc  | ctgccagatg  | gaacacgccc | cgcaacggcg  | 16920 |
| gcatgtcgcg  | atcgatgac   | gcgagcgcac  | ccgatagctg  | ctgccggctc | gccacgtccg  | 16980 |
| catggatgat  | cttgacgttg  | acaccttcca  | gttgtggccg  | aggacgctcg | ctgcgtccca  | 17040 |
| gcagaacgag  | atggcgcgct  | ccggcggcgg  | cgagccatcc  | cgccacctgc | agtcgcagtc  | 17100 |
| cgcgcgagccc | gcccgtgatc  | agatagggtg  | cgtcggcacg  | gaacgccaca | tcgggtgcgg  | 17160 |
| atgggatctt  | gtgaagactg  | agggcgcggc  | cccataccgt  | gccttgccgg | atcgcaactt  | 17220 |
| gacccctctg  | gatattcgac  | agcatcagcg  | tcgcgagatg  | cccgcagtcg | ttgctgtgcg  | 17280 |
| catcgagatc  | gacgagcgtg  | cagcgcagct  | cgggatgctc  | ataggcaatc | gtccgcccac  | 17340 |
| ttccgtgcag  | ccaggcttgt  | cgaatatcaa  | tatctttgtc  | ggagttgaga | accgcggcag  | 17400 |
| atccgcgcgt  | cagcagccac  | agggcgcggc  | gctcaggcca  | gcccgccttg | acgatgctgc  | 17460 |
| gcaatacggg  | aagcaggtcg  | tcgatgcgcg  | gcgagggaca  | gtacacaatt | tgacggcacg  | 17520 |
| gcggacccga  | gcacgtatcg  | gccgtgcggc  | aggtttggcc  | gcgcttttgc | agagtctcgg  | 17580 |
| caatcgccgg  | ctcgccgatg  | acgagccaag  | gtccgccagc  | attgccggca | ttggcatcgc  | 17640 |
| cgcggcggaac | cgacgcggct  | cattgcaccg  | tccaggtggg  | aatctccgat | tcgccgagct  | 17700 |
| ggccgcctatg | ggcgactctc  | gactgcagcc  | ccaccaattc  | cgccaccacg | ctgccgggtg  | 17760 |
| cgggtgacgag | acggacatcc  | accgtggaat  | ccggccgcaa  | gaccgcgtat | cccagaccg   | 17820 |
| ggccagtgagg | cacttcagcg  | agcgagaatc  | ggtccagacc  | taccggcaca | tgcacatctt  | 17880 |
| tcaaactcgtc | gtgatggacg  | agggccgcgg  | gcaactgcag  | acagcagtcg | atcgtctgca  | 17940 |
| tttccgtcag  | cggaatgtcc  | acgcgacaaa  | gcacctcacc  | gttgccgcgc | cagatggggc  | 18000 |
| cgatgggttcg | gaaggtggga  | ccgaagtgat  | agccgcgac   | ccacagtcgc | gaatagaagg  | 18060 |
| catcgggtgt  | gagctccgcc  | gtgcagcggg  | cgcgaatcgc  | atccagatcg | atggatgccg  | 18120 |
| tggaatcgcc  | cgcttcagc   | atgccttcgc  | tgtgcagctt  | ccaggaatcc | tcgcggctgt  | 18180 |
| agatgcggaa  | ggaagctccg  | ccgccctctt  | catgacggag  | taccagttga | acctgcctgg  | 18240 |
| cagcatcggt  | ttccggcagc  | gtcagcgcgc  | ccgtcaatga  | cacgtgttcg | acatgggtgag | 18300 |
| gcccggcgcc  | gagaccttgg  | cgcgcagcgg  | cgagcgccat  | tgccaggtgc | cacgctcccg  | 18360 |
| gagtcacgat  | cacatcgtgc  | agccgggtgat | ccgcgaaatc  | tttcgcctcc | acagtggact  | 18420 |
| cgaactgcat  | ctccggcagc  | ggcgacggga  | tccgccggcc  | aggcaaagcc | tgagactcga  | 18480 |
| cctgcggcgg  | acggatatcg  | atccaataac  | gctcacgctg  | ccagggatag | ttgggcagcc  | 18540 |
| ggcgagtttg  | gccgcggttg  | ggataaatac  | gagaccagtc  | cggagtgcac | ccgttagtca  | 18600 |
| gcagcgcctc  | cagcgtccgg  | cgcagtgcca  | ggtttcgctc  | ttcatcgcgc | cgcaacgagg  | 18660 |
| cagcggcaat  | cgctgcccca  | tctccgagcg  | tttcttggtg  | cggctggacc | aacaacgggt  | 18720 |
| ggggactcag  | ttccagaaac  | acatcatgac  | caccgcgcgc  | ggctgcggcg | acggccgtcg  | 18780 |
| acagcatcac  | gggttggcga  | agattacgag  | cccagtaacg  | agaaaccagc | tcttcaccgc  | 18840 |
| taatcgctgc  | gccggtgacg  | gtggagtaca  | tgccaaaggc  | ggccggccgc | ggctgaagcg  | 18900 |
| ctcccaccac  | gcccggcaac  | gccgcgcaca  | cggagtccat  | cagatggctg | tgcgaggcaa  | 18960 |
| tgtccacttt  | cacgcgacgg  | cagaagacgt  | ctttcgctc   | cagttcccgc | agcagttcgc  | 19020 |
| ccagagctgc  | gctgtcgcgc  | gacaggacgg  | tgtcgcgcgg  | gctgttgctg | gcggcaatcg  | 19080 |

|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| agacccgatc  | cgagcgcccg  | gcatggcag   | cgatggcctc  | gtccagcgct  | aattccacga  | 19140 |
| cagccatttc  | tccctggccg  | cgtactcccg  | cgagcatccg  | gctgcgccag  | caaatcaccc  | 19200 |
| gagcggcttc  | atcgagagtc  | agcgcacctg  | caatgtgcgc  | tgccgcgact  | tcgcccattg  | 19260 |
| tgtggccgat  | cacggcgctc  | ggctcgattc  | cccaatggcg  | ccacagtccg  | gccaaaggcg  | 19320 |
| ccccgactgc  | gaacagggcc  | ggttgaatca  | cgtcgatgcg  | gtcgagcggc  | ccctgcaact  | 19380 |
| cttgcgtcag  | cgaccagtgc  | acgtaaggct  | gcatggcgcg  | gccgcactct  | tcgatggcgg  | 19440 |
| cacggaacac  | cggttcagaa  | gccatcaggt  | cgcggcccat  | gccggggccac | tgcatatcct  | 19500 |
| gtcccggcaa  | aacgaaaacg  | acttttcgct  | tctggccgcg  | cggcacaaaa  | cctgtggcgg  | 19560 |
| tatcgcggtt  | cgggttgccc  | gccagaaaac  | tgtccagccc  | ggccatcaag  | tcctgcgcgt  | 19620 |
| tcgtcccggg  | gaatgccgcg  | cgggtgttcg  | atgaagtgcg  | gcgagcgcac  | gccgtgtagc  | 19680 |
| aggtgtcggc  | ggggttgctg  | ttcaccacgt  | cgcggtatgc  | gcgcgccaga  | tcacgcagcg  | 19740 |
| cctccggact  | gcgcgccgat  | agcggaaagc  | ggtagcgtgc  | gggcgtactg  | gacgcggcct  | 19800 |
| gttgccggcg  | ctgctcgatg  | agcacgtgcg  | cattcgtacc  | gctcaagccg  | aacgagttga  | 19860 |
| tgccggcgac  | gcgcgccccg  | ccgggtgcaa  | ccggccaggg  | ggtgagccgt  | gccgggattt  | 19920 |
| cgagggggaag | cgtgttccaa  | tcgatgtgcg  | ggctgggcgt  | ggtcagattc  | agatggggcg  | 19980 |
| aatggcttc   | gttctgcagc  | atcagcgcca  | ccttgatcag  | tgccggccacg | cccgtgcccg  | 20040 |
| cctcgagggtg | gccgaagtgt  | gtcttcaccg  | acccgagctt  | cagcttgttg  | ccgttggtgc  | 20100 |
| gccccgctcc  | cagcgcgccg  | gcaagggctc  | cggcttcgat  | gggatcgccc  | agcggcgtgc  | 20160 |
| cggttccgtg  | cgcctcgaca  | tagctcacat  | ccagcgtctg  | caagcgcgcg  | tctcccacag  | 20220 |
| cctggcggat  | cacggcttcc  | tgtgcggggc  | cgttcggcgc  | cgtcagtcga  | ttgctgcgtc  | 20280 |
| cgtcctgggt  | gattgcccgt  | ccgcgaatca  | ccgccatcac  | cggatcgcg   | tcgcgcagcg  | 20340 |
| cgtcggagag  | tcgcttcagc  | acaaccacac  | cgcagccctc  | accgcggacg  | tagccgtctg  | 20400 |
| ctgcggcatc  | gaatgcctta  | cagcgaccgt  | cggctgccat  | cgccttcagc  | ttgcagaagt  | 20460 |
| agatcgctcc  | atccggcgag  | agaatcagat  | tgacgccgcc  | cgccagcgcg  | aggtcgcttt  | 20520 |
| cacctgagcg  | caggctctga  | caggcaaggt  | gcaccgcgac  | cagcgatgac  | gagcatgccg  | 20580 |
| tgtcgatcgc  | catgttcggg  | ccctgcagcc  | cgaggatgta  | cgagagacgc  | ccggcggcaa  | 20640 |
| cgtcggccgt  | attgcccgtg  | ccgggtgtacg | cgtcgatatg  | cgcattccccg | ccgcgcattt  | 20700 |
| gcagggttga  | ataatcgttg  | gaaaagatcc  | ccatgaagac  | gccgggtccgg | ctccccgcca  | 20760 |
| gccggtcggg  | tggaagcccg  | gcgttctcga  | tcgcctccca  | ggtgacttcc  | agaagcagcc  | 20820 |
| gctgctgtgg  | atccaggctg  | atcgccctgc  | gcggagcgat  | gccgaagaac  | cgggcgtcaa  | 20880 |
| aacgggtcaac | ctgatcgatg  | aagccgccgt  | accgcgtgta  | cattcggccc  | gtcgcgcggg  | 20940 |
| gatccgggatc | gtagtaggca  | tcgatgtccc  | agcggtcggg  | tggaacttca  | cgtaccgcgc  | 21000 |
| gcgcccttc   | gcgcagcaac  | gaccaatagg  | catcgagatt  | ggatgcgcgc  | gggaagcggc  | 21060 |
| agcccgcgcc  | gatgagggcg  | atgggctcgc  | tgccgcgcgt  | ctccagctgg  | tcgatgcgtt  | 21120 |
| tctgcacctt  | gtcgagcgca  | atcacggcgc  | ggcgaagctt  | gctgagatcg  | tctgacccgc  | 21180 |
| tcattgtttat | tgctgttcca  | accactggtc  | gacctgcgcc  | agccgcgaat  | cgagcagcgc  | 21240 |
| ttccagtctt  | tcgcggggcg  | ggttctcaaa  | ctccggcgct  | tcaccgggtg  | atgcttcggg  | 21300 |
| tggaataacc  | gcatggagca  | cgtaactgac  | gatcgcatcg  | agcgacggat  | agtcgaacag  | 21360 |
| cagactcgcg  | ggcaaaggct  | gccccagtga  | ttgggagagc  | gagttgcgaa  | gttctatggc  | 21420 |
| cattagcgaa  | tcgagtccca  | gttcacccaa  | aggctgctgt  | ggatcgagcg  | gtgtggaaagt | 21480 |
| cgcgatgccg  | acaaagcgcg  | ccagtgaact  | cctgatgtgc  | gcaatgagga  | tggtctcgcg  | 21540 |
| ctgcgggggt  | gtggcttcgt  | tcaagcgggt  | gcgcagttga  | ggtgaaggca  | gcgcggcggg  | 21600 |
| acgcagcaac  | tcgccggtaa  | tcgagcccg   | cggtagcgcg  | gcaatctgaa  | tggggcattc  | 21660 |
| atgcaggacg  | gcctcgagaa  | tgtgtagacc  | ctcgtccacg  | gagaggctcg  | ccacgcgggc  | 21720 |
| catcgactgg  | ctgggtgcgcg | cggccattcc  | ggctcccagc  | cagcgccccc  | agttaatgct  | 21780 |
| ggtcgcccgg  | aaaccagtc   | cgcgcgggtg  | atgcgccagc  | gcatcgagaa  | cggcgttggc  | 21840 |
| cgcggcgtag  | cctgcctgcc  | cggcaggacc  | taagagcgag  | gatgccgatg  | aaaagagcac  | 21900 |
| gaagaagtcg  | agcggcagat  | cgcgggtgtg  | atgatggagg  | tgtacagcgc  | cttccgcctt  | 21960 |
| cggcgccatg  | acgcttgcca  | tccgcgtcca  | gtcctgatcc  | agcagtacgc  | cgtcgtccag  | 22020 |
| cacacccgcg  | gcatggataa  | cgcgcgcgag  | cgggtgacgtt | tcggtgtgga  | tgccggcgaa  | 22080 |

gagatccgcg acctcttctt cccggetgac gtcgaccgtc tctgccgtcg caccaatctg 22140  
ttgcagcacg cgctgctgct cctcgtttgg aggccggcgc ccggccagca cgacgcgagt 22200  
ggcgccgtgc tccaccatcc atttcgcgac tgtaagtccc agggctccga gcccgccggt 22260  
gatcaaataa gtcgcgcccc aaaccagacg gactgccgtc cgcgcgctgg gtcggcgggg 22320  
cagtcgcggc acgtagcgcc ggttgcttct ccacgccgac tgatcttcgc cgtcgaaatc 22380  
acgcatctgc gcggccgcgc cggccgcgca agcatgcgca tcgtcgggat ccagatcgat 22440  
gagcccgccc cacagatccg ggtgctcgcg cgcgatcacc cggccgaagc ccagagcgcc 22500  
ggcctgcatg ggattgtgca ccgcactggg cgcctgcgcg ccggccgtta ccagccatag 22560  
ccgcggaccg gacttcaggg acttcaccag ggccagagtg ctgcggcagc cgagctcata 22620  
atcatcgaga ctgtacaggt tgacgatccc gcgccagtca cgctcaccga ctaggacat 22680  
gtactcgccg gctggcgcca cggtaacgca catctcgccc tgagctgtga gcgcatctgc 22740  
cagagcgccg gccgcgccc cactgtcggc caggatcagc catgccccag gctgtagcgt 22800  
tcgcgaaggc tggcgaggcg gttcggggcg ccactcgacc tcatacaatt cgggcttccg 22860  
ttccgagcgc tgcgcccatt cgcgagtgcg gcgccgaaa ctcacgccct gaagttcccc 22920  
gagaacgcag ccctccgagt ccagcaactg cgcctcgccg gtaaagccgt ccggcgaatg 22980  
ccggagaatt tgcgcggccc ccatacggc gccctccagg ctgccgtaa aacaaacgcg 23040  
atcgataccg agcggagcga atatcggtg ttcggcgcca tccgcaagcg cgggactcgc 23100  
cgcggcgcta agcaattgca ggccggcttc cgccaattca caacggggat tgagcggcgt 23160  
tgcggaatca atcgcgcca gcgcttcttg ttcaccgaaa tgaatgcgct gtatgcggcg 23220  
gtagctcggc ccagttctta tctcgaggtg gcgcagcagc gaatagtagc tgtctccatc 23280  
caccgcaggg ccgcttccat cgaccagtcg gggcacggga gcgacaccag cgtgggcggc 23340  
aatattgccg gcagcatgta agttccacga gccgtcggac aagctgagta tgcggaacga 23400  
ggcatgccgg tcatcgctct gtgaaagcac gagctgaaca gccgtgtcgc gctccgctga 23460  
aaggatcaga ggggtgcgca agttcacgtt ttcacgcgtg tgccggccgg cgccaaacac 23520  
ctccgcccga gcctcgagcg ccatggccag gaagtacacg gccggggcca ccaccgaacc 23580  
gtaatatcgg tggctcgaga gtagaggcga agccgtcgat agtttcgact cgaagataac 23640  
gtctgccacc ggtagcgaca gccggcaccc gacgagacca ctcgcaaccg ctacaggttc 23700  
cggctctgaa ctccgctcga tccaatggcg gcgtctctcg aaaggatagg ccggcagggc 23760  
gacacgcctt cggaataacg gacggtcgaa ctcccgccaa tcgatgtcga acccaccctg 23820  
atatagcgtc gccacactgc tgagaatcgt ctcccactca tcgcggcctt tacgcagcga 23880  
cggcagccac tgcttggcgt cgtcggggcag gcacttttgg cccatgccga gtagaaccgg 23940  
cttaggaccg atctcgagaa acacgtcgca gccttcgctc ttgagcgttt ggataaccgtc 24000  
ggcgaacagg acagggtttc gagcgtgatc tcgccagtag agcggattcg ccagctgtcc 24060  
ctcgccggcc agtttgcccg tgaggttcga aaccaagccg atcgaaggat tgcgccacgc 24120  
gatcgccgcc gcccgcggtt gcaggtccgc cagaatcgga tccatgctcg agctgtgaaa 24180  
ggcgccgcga acggccagca tctgcgtttt gatgccctcc gcacgtagag ttgccagcgc 24240  
gctctcaata tcctgcggcg caccggaaat cagcacctca gcgggtccgt tgatggccgc 24300  
aatggagacg cgcgaggtga tcgctgcggc acagcgctgc tcgccggcgc tgaccgcagc 24360  
catcgcacct tccggcaggt tctgcatgag ccggccgcgt tcggcaacta agccgagcgc 24420  
atccggcagg ctgacggcgc cggcaataca cgccgcccgc tattcgccga cgtgtgtcc 24480  
catcaccagg tcgggcgtca caccggagga ctccacaac tgcgccaagg cccactgcaa 24540  
agcaaacagc gcgggctgcg cgccggcggt cgcgtcgagc aacgcgtcat cggccaacag 24600  
cgccggcaga tcgagccgtc cattcagcag agctgcgcat tcatccatgg cggcgcgaaa 24660  
caccggctgc gactcgtaga actggcgggc catgcccgcg tattgcgcac cttgcccggg 24720  
gaaaagaaac gcaatcttgg ggcgcgtctg ggcgatgcga acccgctcgt cctccgtcag 24780  
tcgttggcga gcctcgtcgc tcgaccgggc cacaatgcag atacgggtgc ggaagtgcac 24840  
gcgccctgca ttggccgtga atgcgacatc gccgaacgac aaaccgggct ggttgtccat 24900  
atggccgcga tacgagcgca ccagttcttc cggggcgagc tgcggccggc gtcaccggcg 24960  
aagcacatgt gcggatcgtt cggggcgagc gtcaccggcg gcgcttctgc 25020  
cagaatcacg tgagcgttgg tgccgcccag cccgaacgaa ctgactgccg ctcgtctcgg 25080

|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| gggtctttccg | gcgggccagt  | cgagcagccg  | cgtactcaca  | cgaaacggag  | tgtttgcgaa  | 25140 |
| atcaattcgc  | ggattcggac  | gctggaaatt  | caggctggga  | ggaatctggc  | cgcgatggac  | 25200 |
| ggcaagcacc  | gtcttgatca  | gcccggccac  | accggccgcg  | acgtctagat  | gaccgatgtt  | 25260 |
| gggtcttgacg | gatccgatat  | acacatcgcc  | gcttccggtt  | ttcggaagt   | tggcagcgat  | 25320 |
| ggcggcgatc  | tccaccggat  | cgccgagcgg  | cgtggctgtt  | ccgtgggcct  | cgatgtagcc  | 25380 |
| gatggactcc  | ggcttcacgc  | ccgccatctc  | ttgagtgcgc  | cgaatcaatc  | gcgtctgacc  | 25440 |
| gtccacacct  | ggagcggtaa  | accccatgcy  | ctcggcgcca  | tcattattaa  | tagccgctcc  | 25500 |
| gcgaatgacg  | gcgtagatcg  | tgtegccatc  | ggccagagcg  | cggctcaagc  | gcttgaggac  | 25560 |
| gaccacaccc  | gcgccgttgc  | ccggcacccgt | gccttgagcg  | gactcatcga  | aggcgcgga   | 25620 |
| gcgcccgtcg  | ggcgacagga  | tcattgcccgg | ctgggtgcagg | taccccacgg  | actgcgggaa  | 25680 |
| attgatggca  | actcccccg   | ccaaggcaat  | gtccgagggc  | ccgcgctgca  | agctctcgca  | 25740 |
| tgccatcacc  | accgacacca  | gcgaggtgga  | gcacgccgtc  | tgaaccgtca  | ggctgggccc  | 25800 |
| gcggaggttc  | agcttgtaag  | agacacgcgt  | ggccaggaaa  | tccttgctcg  | tggccgtcag  | 25860 |
| cagctggtag  | gcggaggggc  | gtgagaaatc  | gaacggctcc  | gcggtaggca  | ggttgttcag  | 25920 |
| caggtaggta  | ttgacgccgc  | atcccgcgaa  | aacggcgatc  | gaacccttat  | agcttcgcgc  | 25980 |
| gcgatatccc  | gcgtttctca  | tcgcttccca  | cgcgactctg  | agaaacacgc  | gatgctgcgg  | 26040 |
| gtccatgata  | tcgcttctgc  | gcggactgta  | gccgaagaac  | gcggcatcga  | aaaactcgat  | 26100 |
| gccgtccagc  | agacccttgg  | ccggcacgta  | gctcgggtcc  | tggagacact  | ccgggctgat  | 26160 |
| gccgcccgcg  | agcagatctt  | ccggcgaaa   | cctggcgatg  | gaatccacac  | cgtcgcgcag  | 26220 |
| attgcgccag  | aactcctcca  | cattgcgcgc  | ccccgggaac  | cgcccgcca   | tcccataaac  | 26280 |
| tgcgatccga  | tcttctgcga  | ccgcagccgc  | aggttccgca  | gcggcggggt  | cggatttttc  | 26340 |
| tgccaggccg  | gcaagcgact  | cgatcgtcgt  | atgccggaac  | agatcgacga  | cggagagcgt  | 26400 |
| caaccccagg  | cgctcctcga  | gcagtccgcg  | caccggtgtg  | agcattagcg  | agtgcgccgc  | 26460 |
| gacatcaaag  | aagttctgcc  | gatagtcgac  | gtgctccacg  | cgcagaactt  | cacgccagat  | 26520 |
| ggacgcaatc  | gtctccacca  | catcgccgcg  | catcggtctg  | cgagcagcaa  | ccggcggtgt  | 26580 |
| gggcaaaccg  | ggaagcgcg   | tcgcgtcgat  | tttgccgttg  | ggcgtagcgc  | gaaggaggga  | 26640 |
| caggctgaca  | aacgccgagg  | ggatcatgta  | atcgggaagg  | cgcgtagcca  | gccacgaccg  | 26700 |
| caaactcgct  | tgcatatcgc  | gcacgtcgcc  | cgtagccgga  | acgagatagg  | cgatcagccg  | 26760 |
| atcgctcctt  | acgaccgtaa  | tcgcctgctt  | cacggcaatg  | tgcgctctga  | tcgcggcctc  | 26820 |
| aatctcggcc  | ggttcgatgc  | gaaacccgcg  | cagcttgatc  | tggcgatcga  | ctcgtcccag  | 26880 |
| gcaactcgact | gcgccgtcgc  | aacggtagcg  | agccagatcg  | ccggtagagt  | aaatgcgtcc  | 26940 |
| tcgatcacgc  | cactcgcgga  | atttctcacg  | cgtgagctcg  | gggttgcat   | gatagccccg  | 27000 |
| gccagtccc   | gctcctccga  | tgtacagctc  | tcccggaaact | ccggggggaa  | ccggctccat  | 27060 |
| gcgcgaatcc  | aggatgtata  | actgcgtgtt  | gtcgatggga  | tggccgatcg  | gcacgatgct  | 27120 |
| atcgagggca  | cccagtcctt  | gtgtcttgtg  | cacggccgac  | catatggtgg  | tctccgtcgg  | 27180 |
| tccgtaaaga  | ttccacagct  | ctacgccact  | atcgagaatg  | cgccgcgcca  | gttccggcgg  | 27240 |
| cagagcttca  | ccgccgcaga  | aaacacggaa  | gcctttaccc  | ggcttccagc  | ccgaatccag  | 27300 |
| caattgccgc  | caaccgctcg  | gggtcgccctg | catgaccgta  | gcgcccgcact | tatccagcag  | 27360 |
| ggtagtgagc  | cgctcgccgt  | caaccacgat  | ctcgcggtg   | gcgacgatga  | cgccggcgcc  | 27420 |
| ggtagatcaac | ggcagccaga  | tctccagctc  | ggcaatatcg  | aatgacacgg  | tggtagcggc  | 27480 |
| gaccagccca  | tcggcggtcg  | tcagaccgcg  | ctcgcgctgc  | atggagcgca  | gcagattgac  | 27540 |
| tagcgacgag  | tggcggtatc  | ccacgccctt  | cggctcgccc  | gtcgatccgg  | aggatatatat | 27600 |
| gatgtaggag  | agatcgctcg  | gcttgctgcc  | gctgacgaga  | ttcgagctt   | ctggttcgac  | 27660 |
| ggcgaccgcc  | atcatcgcca  | tcacgcccat  | catctcagcc  | accgcctcct  | gcgtgaggac  | 27720 |
| cgcgtgcgg   | tgcacttcat  | cgagaatccg  | ggcgagacga  | tccttgggg   | gcgcgggata  | 27780 |
| gagaggcagg  | tacgcgctgc  | cggacttcag  | aatcgcaagc  | agcgcaatca  | ccatctccag  | 27840 |
| cgagcgctcc  | atcgccagag  | cgatgatctt  | tcccggggcc  | gcgcgggatg  | cgctcagacg  | 27900 |
| atgagccagg  | cgggttggccc | gcgcattcag  | ctcggcgtag  | gtcaactgat  | ggcttccgaa  | 27960 |
| gacaacggcg  | acggcggtcg  | gagtgcgctt  | cgcctgagct  | tcgaccagtt  | catgcgcaca  | 28020 |
| cccgttcgga  | ccggcatcgc  | gccgtgtcgc  | attgtgctgc  | tcgagcatcc  | ggcttcggac  | 28080 |

cgcggggggac aacagcgcag cggttgaaat gcggaacgtcg ggatccgtca ccacgctcgc 28140  
cagcagggtt cggtacgcat cgagcaggga ggcgatgggt gccgcatcga acaaacgggt 28200  
gttgatttcg gcggacgcca tcagtccatc gccggatggc tcgaggggtca cgccgagggtc 28260  
gagtttggat ccgccgttgt gcatgtactc gcgcgagatg gtgagcccag gcatgacgggt 28320  
gatggccggc gcatcgggca gcagcgcgaa ggagacctga aatacaggcg accgggtcag 28380  
gtcccgcgga ggatgcagtt cctcaaccag gcgttcgaaa ggaaagtccg gatgagagag 28440  
ggcgctcaaa gcggtgtcgc ggggtgcgggc gagaagactg cgaaacgacg gatcgtcgcg 28500  
cagatcgccg cgcaggacga tcatgttggc gaaacaaccg acgagacctt ccgtttctcg 28560  
ttgtgtacgg ccgcgactg gaaccccgat aaggatgtct tcctgcgcgg tatagcgatg 28620  
cagcagcacc tgaaacgcgc cgattgcccgt catgaacacc gtgcgtccct caccgaaggc 28680  
aaacgcgtgg agtccatcgc tcaaatacag gccgagggtc gtggtctcca cggcgccccg 28740  
ccaggctctgc tgcgcggggc gggggcgatc ggtaggaagg tcgaggaaag gcaagggtgcc 28800  
cgacagctgt ttcttccagt actgctgcgc ggtttggttc agcgacgtct gctgatggac 28860  
ggcccagtcg ccatactgaa tcggcagttc catgagcggc gatggccgcc cctgcacgaa 28920  
cgcttcgtac gatcgcgtca ggtcgcggac gaacgtctcg accgaccacg catccgcgat 28980  
gatgtggctc aacgtcagca ggagaatctg ctgcttgtca tcgaggcaga tcagcttgggt 29040  
ccgcagaagc ggggggttttc gcaggtcgaa cgggatctgg gcatcacgca aggccatttg 29100  
ccgcgcttct gcgattccgt cagcctgaac aaccggaagt tccagtgtca ctgcgcgccg 29160  
gaggctctgg cgcgcctctc catccacacc gccaatgcag ctgcgcaggc tctcgtgccg 29220  
ctgcaccacg gcctccagac tccgcaggag gacgcgaata tccagcggac ctcgatatg 29280  
cagcgtatg ggaatgttgt aggcgggaga atccgggtcg agctgatgga gaaaccaaag 29340  
ccgctgctgg gccagcgaca aggggtgcggc atcccggttt tcacgcgcgc ggatgcatg 29400  
ttcggggctg ttttccctgca gcagacggtc gagcaattgg cggcggggcga gcgagagggtc 29460  
tatggtat ttttcctgca tctgcattac aaccgcgtgt gtctcctagtc ttgggcggcg 29520  
ctcatcatat gctcgatttg aacatctgac atttgggaaa cagcgatcag caaatcggcg 29580  
gctcgccttg cccatccctg gtctacgcgc tctgaatag cgacggcgaa gcctcgaacc 29640  
gtggggggcgt taaacacggt tcgaaagggc acttccacgt ggagcatgtc gcgcacgcgg 29700  
gcgatcatct gcgtgaccag cagcgaatgt cctccagagt cgaagaagtg atcatggacg 29760  
ccgatgccat ccatgccgag caactcgccc caaatgtggg cgagtacctg ttccaccgga 29820  
gtttccggag gcgtgaatgc ttcggcgtgg gctcgcggc tgggctcggg atcgggcagg 29880  
gcgttacggc cgatttttcc gttgggcgtc agcggcattt cgtggagcac gaccacgcg 29940  
gtcgggatca ttagtcggg cagcttctcc ttcagatgag tacgcaactg cggcacaacc 30000  
gtgcgcgtat agacggctcg cagcggatcg ttcgtatacg ggccggccag gcggcgtcgc 30060  
ggacgggaag ccggcggacc ggccgcgcga cggcagaagg tcgcgtcgaa gcgtccgtgt 30120  
ggcccatgac tgcctcagtc gattgccacg cggtacggca ggtcttcgtc catacgccat 30180  
agatcggcgg gatcgacgcc ggaaggcgac gtctggcgca gccggtcccg caactccccg 30240  
agtgtctctg gagcttcgtc accgttcatc caggtcacaa tggcgcttcc ggcggtcaac 30300  
cgtgcgttcg gaatctcggg aaatgcggcc aactccggct gagcgtccgt cagtactctg 30360  
cgtatttcgg ccgcgggtctg gcaacgcctg cgatccgatt ccggctcctc cgcttcccgc 30420  
gatccgatat gcaggatcgc ctggtagcgg aagcgggtca gctcgttatg cgaccggccg 30480  
cgacgcggca ggatttcaat ccggccgac tccggaatct gttcgcggag agcaaagaag 30540  
aacgcgggat cgaccacgag ttcctcttcc tgcgacgcga gcgaacgcac gcgttgccga 30600  
aactcattcc gggtaacga cgcgggtgcg cgctgaactt ctaaagaagc gtaaaacgtc 30660  
tccagcagcg ggagactgcg gacatcgccg acaaatacga tgccgcccgg tttgaccaca 30720  
cgcaccgcct cggccagcac gcgcgcgaga tacgcttcgc cggggaagta ctggataacg 30780  
gagttcagaa caaccgcac gcacgagcga ctgtcgatct cgcacgcgtc gtcggccgcc 30840  
tgccggaacg tgcggacatt tgccaggccg gtgcggtcgc cgtgagcggc gatgtagtcc 30900  
agcgccttct gcgaaaagtc cgtggcccag tactccgaac agtggggagc gacgcggaag 30960  
agcagcagtc ccgtaccaca gccaatctcg agcagcgcac gcggccgcga ggccaggatg 31020  
cgatcgacgg aatcctgcac ccactcccgc atctcggcag ctggaatcgg ctctccggtg 31080



|             |            |            |            |            |             |       |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| acactgcttc  | tccagccgac | gatgttgaac | tccggatccg | cgttcggcgc | attctgttca  | 31140 |
| tatgtggtgt  | cccagacgga | ttgccactgc | gtcacgtgct | cggactcgac | tccgtcgtgg  | 31200 |
| aatgtgtcgg  | cggctgccgt | cgcgcgatgc | ccgtcagcaa | gggggacaat | gtaggccgcc  | 31260 |
| agatacttac  | cggccgcgtc | atcttctctg | gcggtgacca | cagcatgtcg | gaccgccggg  | 31320 |
| tgactgcgga  | ccgcggcctc | gatctcgccg | gtttcgatgc | ggaacccgcg | tatcttcacc  | 31380 |
| tggtggtcga  | tccggccgag | atactcgagc | gcgccgtcgc | gttggcggcg | ggcgagatct  | 31440 |
| cccgtgcgat  | acagccgagt | gccatgaggg | tccaacgaat | tggcgacgaa | cttgtccgcg  | 31500 |
| ctgagttccg  | gacgattcag | gtatccacgg | gcgagcccg  | cgcgcgcgat | gtacagtctg  | 31560 |
| cccgaacac   | cgatgggtgc | gggctgcac  | cgatcgtcaa | gcacatagag | ctgagtgttt  | 31620 |
| gcgatggggc  | ggccaatcga | aaccggtccg | tcacctgtcg | tcacccgttg | gatggcggac  | 31680 |
| caaattgtcg  | tttcggtagg | tccgtaaaga | ttccatagcg | ccgcggttcg | ttgcaggagc  | 31740 |
| cggtcggcaa  | gatcgcgagg | aagggttca  | ccgccgcaga | gcgccgtcag | gcggcggctg  | 31800 |
| ccgggcccagc | cggatgcgag | cagcagacgc | cagggtggcg | gagttgcctg | catcattgtc  | 31860 |
| gctttgctgc  | gcgcgagttc | cctcgccagc | ctctcaccat | cgacggccgt | ctcctggttc  | 31920 |
| gccaccacga  | cgcgcgcgcc | ggcgtcaag  | ggcaaaaaga | tctcgagcgc | ggaaatgtcg  | 31980 |
| aacatgaacg  | tctgaggggc | gagcagcgta | tgcgggtcgc | tgatgcccg  | ctcatgccgc  | 32040 |
| atcgacgaaa  | gaaaattgac | gacggcctgg | tgtgtgattt | gcacgccttt | cggccggccg  | 32100 |
| gtcgaaccgg  | aggtgtacag | gacataggcg | agatcggcgg | gagtcgcgag | cgggttcgga  | 32160 |
| ttggtgtcgg  | gctgcgtcca | tacttccgat | tccgtgacat | tcagcacaac | gaccggcctg  | 32220 |
| gtctcttcca  | gcatcagccg | aagacgttgc | gccggatatt | ccggttccag | cggaaacgtag | 32280 |
| gccgcgcggg  | ccttcaggac | gcccacacgc | cctgcgacgg | tttcgagcga | ccgcgtgaca  | 32340 |
| tggatgccaa  | ccatttcgcc | gggtccagcg | ccgcgcgagc | ggagatagtg | cgcgatccgg  | 32400 |
| ttggcgctcc  | cgttgagttc | gcgatatgtc | agattctgct | caccgaagct | caacgcgatg  | 32460 |
| gcgtcggggc  | tcaactccac | ctgagcttcg | aacagctcgt | gcacgcattg | ggacgggaat  | 32520 |
| tccgcggcgg  | tgcatttcca | ctcttcgagc | agctggatgc | gttcccgggt | tgtcagcagc  | 32580 |
| ggtagatcga  | caactggaca | ggcgggattc | tccgcgattc | cttcagcag  | cacggcgaag  | 32640 |
| tgcaaggaga  | gacgttcaat | cgtggcagca | tcaaaaatgt | ccgtgttgta | ttgcagaaag  | 32700 |
| gcggagaggc  | ctccatcggg | ttcgaccatc | atcagatcca | ggtcaaaccg | gctctgtcgc  | 32760 |
| agcggcatcg  | ccagggactc | cagtgtgagg | ctgcccagcg | ccatgcgacc | gccggactga  | 32820 |
| cccaacatga  | acggcacgga | ttcggaatg  | cgatgaggct | gctggagcac | gaatagaacc  | 32880 |
| cgcagtccgg  | gacccaaccg | ctccacgatc | cgggcatacg | ggtactcctg | gtgctcgatc  | 32940 |
| gcgccgagaa  | gcgtttgcgc | aatccggggc | agcaccgtat | tgaaatccgg | atcgccctgaa | 33000 |
| agttctcctc  | gcaggattac | gggattcacg | aagtatccga | cgagatcggc | gaattccggg  | 33060 |
| tgcttccgac  | cgttggtgag | ggtgcgggtc | aggatctctt | cttgtgaggt | ccaacgggag  | 33120 |
| agaagcactt  | gaaacgcgcg | catcagcgtc | gcatgcagcg | tgcggttctg | ccgccgcgcg  | 33180 |
| agcgccctca  | gttttcgagt | cagcgcgggt | tcgattcggg | acgagtgaga | gtttccccgg  | 33240 |
| aaactctgca  | ccggcggact | gggacgatcc | gacgggagat | tcagaaccgg | aagctggccg  | 33300 |
| gaaagctgcg  | aggaccagta | gttccaaagc | cgctcgccct | cggttccggc | caacagtctg  | 33360 |
| ttctgccagc  | ggacgaaagc | ggcgaagctc | gcgaccggcg | gcgcgacagg | cggaccgcca  | 33420 |
| gctgtcctcg  | cgaggtagat | actgcggagt | tcatccacca | tcaccagcag | tgaccagaag  | 33480 |
| tccggcgagga | tgtgatgcac | cacgatggcc | agaacctgat | ccttccccga | ctgcaccagg  | 33540 |
| agacgcgagc  | ggaaacagtt | ttcgccgaga | ttgaaggggc | cgtggaagac | gccgtcgatc  | 33600 |
| agcaccgcct  | catcgtccgg | cgaacacggg | atcacttcga | aatccaccgg | gacgctgctg  | 33660 |
| tggaccgttt  | gaacgggtgc | gccgccactc | tccgcaatcg | tcgttcgcag | cgcgggatga  | 33720 |
| cgatccacca  | ggtcctgcag | cgaacggcgc | aacgcctgcg | gatcgaaagc | gcctctcgcg  | 33780 |
| cgcgcgatcc  | acgcgatgtt | gtatgcggga | ctttccggcg | cgcttcggta | aataaaacca  | 33840 |
| agcgccctgt  | ggccggcgct | gagagggtag | gagagggcag | gaaccgaggc | ctgcgccgca  | 33900 |
| ggttccggcg  | ccaccgtcgt | gcgttcgctg | aggccgctta | gatcgcttag | atccctggcc  | 33960 |
| agttccgcaa  | cgttggggcc | gtctagaaat | cggaccatgg | gcagcaagac | gcgcgatcc   | 34020 |
| gtatcgatcc  | ggttgcgtaa | ttgcaccgcc | atgagcgagt | ccaatcccat | acgcaccagc  | 34080 |

|             |             |             |             |            |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| ggctgctgta  | agtccaccgc  | cgattccggg  | cactgcagtt  | tttttttttt | tttttttttt  | 34140 |
| tttttttttt  | tttttttttt  | tttttttttt  | tttttttttt  | ttttaatgcg | gtagttttatc | 34200 |
| acagttaaat  | tgctaacgca  | gtcaggcacc  | gtgtatgaaa  | tctaacaatg | cgctcatcgt  | 34260 |
| catcctcggc  | accgtcaccc  | tggatgctgt  | aggcataggc  | ttggttatgc | cggtactgcc  | 34320 |
| gggcctcttg  | cgggatgata  | cctgtcagtc  | atgcgggcaa  | cttagccgag | ccctacgaca  | 34380 |
| ccgcccgtgg  | gaaggtgagt  | gtctaactgc  | gtgacaacgc  | cagcgcacag | cggcggacaa  | 34440 |
| ccgcgagcac  | ccatggactg  | gcgcccaggg  | tgagaagcac  | actggcccaa | ggtcgagcgc  | 34500 |
| ccacccaagt  | tgcttcggga  | cgaagaggtc  | gtgggttcaa  | atcccgcac  | cccgcacagag | 34560 |
| aaacaccagg  | tgaggcagac  | cgtaacgtta  | cggtctgcct  | cacctgtttt | ctgtgcgtgt  | 34620 |
| ctatctgcgt  | gactatcgcg  | ccggaccccg  | cttgaagatg  | ccgtccatga | ccacagcgcc  | 34680 |
| ggtctggatg  | acgggcccga  | tctgtctccg  | gtagacctcc  | tcagtcacgg | ccgtaccgga  | 34740 |
| gtgtccgacg  | agccgggaga  | tctcctccag  | cgggacgccc  | cggtcggaca | gcagggacac  | 34800 |
| gaagctgtgc  | ctcagctccc  | tcgggtgtcca | ctcgtcggcg  | ttgatcccgt | tggcatcctt  | 34860 |
| gagcgcctgg  | cggaaggcgc  | gccggacgtt  | agtgcgcgtc  | agcggccttg | caacggccga  | 34920 |
| cgagaagacc  | aggccgtgtt  | cctcccactt  | gtcacccggc  | gcgagccgtt | cccagccctg  | 34980 |
| gtcctcaaag  | tgctgccaga  | ggacctccac  | gcaacgcgcc  | ggcaggggca | gcgttcgccg  | 35040 |
| agacttcggg  | gttttcgtgt  | ccccaccgcg  | ccggaccgag  | cgccagacgg | cgatgtgcgg  | 35100 |
| aggctgcggc  | ggctcaacgt  | ccggacttcc  | cttgagggaag | acgtggtccc | aggtcagcgc  | 35160 |
| ccgcagctcc  | tcgggtgcgc  | caccgggtcag | cagggcgacg  | acgatgtagg | cgtgcacga   | 35220 |
| cgtgccctcg  | gcagcattca  | gcaccgcctc  | ggcctgggcg  | aagggtgagc | ccttggacgg  | 35280 |
| ccggccaggc  | tggccctggg  | gcacagagca  | cagctccacc  | acgttgcgct | tcaccttgte  | 35340 |
| acgcgccatg  | gcccgccttga | ccgcccgggt  | caggcaggag  | tggaccgcct | gaaggctgcg  | 35400 |
| cgtgctcaga  | gtctgagcct  | tggcgggccag | ccagcggctg  | acgtcctctg | cgtgaggtc   | 35460 |
| acgcagcttc  | cgggcaccca  | aaccgcgtat  | gacgtgcttc  | tggcttaggt | gggtgcagtt  | 35520 |
| ctcgacgggtg | cgctgggtcac | ggccagcgag  | accgtaggca  | agccagtcgt | tcaccgcgtc  | 35580 |
| ggcgacgggtg | taccccggtg  | gtgcgatcgc  | gagaccgtct  | tcgtggtcac | gcagaacctc  | 35640 |
| tttgagcttg  | ttcttagcct  | ccgtcttggt  | cttgccactc  | ccccgcctga | cgatccgctt  | 35700 |
| accgctcgga  | tcgaagccga  | ggttcgccgt  | ggcgatccag  | cgctgtctct | tctcgtccca  | 35760 |
| gtggaggccg  | ccgtcacccc  | ggctacgtcg  | cttggccatg  | gatcgatccc | ctgcccggca  | 35820 |
| aaatagagtg  | ttcctctgcc  | ctcttttagca | ttcagtgtat  | ccattaccgt | catcaattgc  | 35880 |
| tcactcccgg  | ggcgcggtgc  | gttgtcatcg  | aataaattga  | gctgcgcgac | tccctgactg  | 35940 |
| aagaaatccc  | ccagcatcac  | gcccgccttt  | tggtaacgat  | ggcccgcctg | ccagatggca  | 36000 |
| tccagagatc  | gcgtagcagc  | gttaatgata  | tccctgctgt  | cctgagtggt | cgtcagcagt  | 36060 |
| tttaccgacg  | cgctattgcc  | gtaataaggt  | tcattgagcg  | caaattgggt | cgtcttaata  | 36120 |
| aacgtggaga  | taaaccgaca  | atattgatgc  | tcgctgcgaa  | gtttttccgc | cgcccgggca  | 36180 |
| gcgtaactac  | aatggcctg   | ccgcacgcac  | ggataatccg  | tgatgcgttc | accaaaccgag | 36240 |
| cgggaacaga  | taatttccctg | cttcgtcggt  | gcaaactctt  | ccagttgcaa | acagggttcg  | 36300 |
| ccgcgcagtt  | cacgcaccgt  | tcttttcgagc | acgacattaa  | aatgtttacg | gataaaccgg  | 36360 |
| atatctgtat  | ccgccaaatc  | gagaacgggt  | ttgatcccca  | tcgcgtccag | ttttttgctg  | 36420 |
| atccgccgtc  | caatccccca  | gacgtcatcc  | acggggagag  | cagacattaa | tttacgctgg  | 36480 |
| cgttccagat  | ttgataaata  | caccacccca  | ccgctctgcc  | gctgccattt | ttttgccgca  | 36540 |
| tgattggcaa  | gctagcttta  | tgcttgtaaa  | ccgttttggt  | aaaaaatatt | taaaataaaa  | 36600 |
| aaggggacct  | ctagggtccc  | caattaatta  | gtaataaat   | ctattaaagg | tcattcaaaa  | 36660 |
| ggtcatccac  | cggatcagct  | tagtaaagcc  | ctcgtatgat  | tttaatgcgg | atgttgcgat  | 36720 |
| tacttcgcca  | actattgcga  | taacaagaaa  | aagccagcct  | ttcatgatat | atctcccaat  | 36780 |
| ttgtgtaggg  | cttattatgc  | acgtttaaaa  | ataataaaa   | cagacttgac | ctgatagttt  | 36840 |
| ggctgtgagc  | aattatgtgc  | ttagtgcatc  | taacgcttga  | gttaagccgc | gccgcgaagc  | 36900 |
| ggcgtcggct  | tgaacgaatt  | gttagacatt  | atgtgccgac  | taccttggtg | atctcgcctt  | 36960 |
| tcacgtagt   | gacaaattct  | tccaactgat  | ctgcgcggat  | cgatccttgc | cgagctggga  | 37020 |
| tggaaagccc  | gccgacccac  | cctggaggag  | atgatcgagg  | atgccagggc | ctttcacgcc  | 37080 |

|             |             |             |            |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
| cgccgctgct  | gagcgtccgc  | cgccggggccc | gcaccgccgt | cgccggggccc | gctccggggt  | 37140 |
| cgcagcagcg  | ggcttcggcg  | cgggcccggg  | gctcccgggc | cgccggggcgg | ggctccgccc  | 37200 |
| ggcggccgcc  | gggggcccggg | ggcggcgccg  | ggcggcccgg | ggcgtcaggc  | gccgggggcg  | 37260 |
| gtgtccggcg  | gccccagag   | gaactgcgcc  | agtctctccg | gatcggtgaa  | gccggagaga  | 37320 |
| tccagcgggg  | tctctcgaa   | cacctcgaag  | tcgtgcagga | aggtgaaggc  | gagcagttcg  | 37380 |
| cgggcgaaagt | ntcgggtccg  | cttccactgc  | gccccgtcga | gcagcgcggc  | caggatctcg  | 37440 |
| cggtcgcccc  | ggaaggcggt  | gagatgcagt  | tgcaccaggc | tgtagcggga  | gtctcccgcg  | 37500 |
| tagacgtcgg  | tgaagtcgac  | gatcccgggtg | acctcggtcg | cgcccgaggtc | cacgaagatg  | 37560 |
| ttgggtcccg  | gcaggtegcc  | gtggacgaac  | cggggttcgc | ggccggccag  | cagcgtgtcc  | 37620 |
| acgtccggca  | gccagtcttc  | caggcggtcc  | agcagccggg | gcgagaggta  | gccccaccgc  | 37680 |
| cgggtggtcct | cgacggtcgc  | cgcgcggcgt  | tcccgcagca | gttccgggaa  | gacctcgga   | 37740 |
| tgggggggtga | gcacggtgtt  | cccggtcagc  | ggcaccctgt | gcagccggcc  | gagcaccgcg  | 37800 |
| ccgagttcgc  | ggggccagggc | gagcagcgcg  | ttccggtcgg | tcgtgccgtc  | catcgcgga   | 37860 |
| cgccaggtgg  | tgccgggtcat | ccgggtcatc  | accaggtagg | gccacggcca  | ggctccgggtg | 37920 |
| ccggggccgca | gctcgccgcg  | gccgaggagg  | cggggcaccg | gcaccggggc  | gtccgcccagg | 37980 |
| cccggtacg   | cctccgactc  | cgacgcgagg  | ctctccggac | cgcaccagtg  | ctcgccgaac  | 38040 |
| agcttgatca  | ccggggccggg | ctcgccgacc  | agtacggggt | tggtgctctc  | gccgggcacc  | 38100 |
| cgcagcaccg  | gcggcaccgg  | cagcccagagc | tcctccaggg | ctcggcgggc  | cagcggctcc  | 38160 |
| cagaattcct  | ggtcgttccg  | caggctcgcg  | taggaatcat | ccgaatcaat  | acggtcgaga  | 38220 |
| agtaacaggg  | attcttgtgt  | cacagcgga   | ctctattcac | agggtacggg  | ccggcttaat  | 38280 |
| tccgcacggc  | cggtcgcgac  | acggcctgtc  | cgcaccgcgg | atcaggcggt  | gacgatgacg  | 38340 |
| ggctggtcgg  | ccacgtcggg  | gacgttctcg  | gtggtgctgc | ggtcggggtc  | gccaatctct  | 38400 |
| acggggccgac | cgaggcgacg  | gtgtacgcca  | cagcttgggc | taatcatggt  | catagctgtt  | 38460 |
| tctgtgtga   | aattgttatc  | cgctcacaat  | tccacacaa  | atacgagccg  | gaagcataaa  | 38520 |
| gtgtaaagcc  | tgggggtgcct | aatgagtgag  | ctaactcaca | ttacggatca  | gtgagggttt  | 38580 |
| gcaactgcgg  | gtcaaggatc  | tggatttcga  | tcacggcacg | atcatcggtc  | gggagggcaa  | 38640 |
| ggggtccaag  | gatcgggcct  | tgatgttacc  | cgagagcttg | gcaccagacc  | tgcgcgagca  | 38700 |
| gggggaattga | tccgggtggat | gaccttttga  | atgaccttta | atagattata  | ttactaatta  | 38760 |
| attggggacc  | ctagagggtcc | ccttttttat  | tttaaaaatt | ttttcacaaa  | acggttttaca | 38820 |
| agcataaagc  | tatcgtccat  | tccgacagca  | tcgccagtcg | ctatggcggtg | ctgctagcgc  | 38880 |
| tatatgcgtt  | gatgcaattt  | ctatgcgcac  | ccgttctcgg | agcactgtcc  | gaccgctttg  | 38940 |
| gccgccgccc  | agtccgtgctc | gcttcgctac  | ttggagccac | tatcgactac  | gcgatcatgg  | 39000 |
| jaccacacc   | cgctcctgtg  | atctgcctcg  | ctggcctgcc | gcagttcttc  | aacctcccgg  | 39060 |
| cgcagctttt  | cgttctcaat  | ttcagcatcc  | ctttcggcat | accattttat  | gacggcggca  | 39120 |
| gagtcataaa  | gcacctcatt  | acccttgcca  | ccgcctcgca | gaacgggcat  | tccctgttcc  | 39180 |
| tgccagttct  | gaatggtacg  | gatactcgca  | ccgaaaatgt | cagccagctg  | ctttttgttg  | 39240 |
| acttccattg  | ttcattccac  | ggacaaaaac  | agagaaaagg | aacgacagag  | gccaaaaagc  | 39300 |
| tcgctttcag  | cacctgtcgt  | ttcctttctt  | ttcagagggt | atttttaaata | aaaacattaa  | 39360 |
| gttatgacga  | agaagaacgg  | aaacgcctta  | aaccggaaaa | ttttcataaa  | tagcgaaaac  | 39420 |
| ccgcgaggtc  | gccgccccgt  | aacaaggcgg  | atcgccggaa | aggacccgca  | aatgataata  | 39480 |
| attatcaatt  | gcatactatc  | gacggcactg  | ctgccagata | acaccaccgg  | ggaaacattc  | 39540 |
| catcatgatg  | gccgtgcgga  | cataggaagc  | cagttcatcc | atcgctttct  | tgtctgctgc  | 39600 |
| catttgcttt  | gtgacatcca  | gcgccgcaca  | ttcagcagcg | tttttcagcg  | cgttttcgat  | 39660 |
| caacgtttca  | atgttggtat  | caacaccagg  | tttaactttg | aacttatcgg  | cactgacggt  | 39720 |
| taccttggtc  | tgcgctggct  | catcacgctg  | gataccaagg | ctgatgttgt  | agatattggt  | 39780 |
| caccggctga  | ggtgtttcga  | ttgccgctgc  | gtggatagca | ccatttgcg   | tagcggcgctc | 39840 |
| cttgatgaat  | gacactccat  | tgcgaataag  | ttcgaaggag | acgggtgtcac | gaatgcgctg  | 39900 |
| gtccagctcg  | tcgattgcct  | tttgtgcagc  | agaggatca  | atctcaacgc  | caagcgctcat | 39960 |
| cgaagcgcaa  | tattgtgtgt  | cacccaaaacg | cgtattgacc | aggtgttcaa  | cggcaaattt  | 40020 |
| ctgcccttct  | gatgtcagaa  | aggtaaaagt  | attttctttc | tggtattcag  | ttgctgtgtg  | 40080 |

tctggtttca gcaaaaccaa gctcgcgcaa ttcggctgtg ccagatttag aaggcagatc 40140  
accagacagc aacgcgccac ggaaaaacag cgcatacaga acatccgtcg ccgcgccgga 40200  
caacgtgata attttatgac ccatgattta tttcctttta gacgtgagcc tgcgcacag 40260  
caaagccgcc gaaagttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 40320  
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtg ggtttgtcca 40380  
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tctgacgggt gcgcatgac gtgctcctgt 40440  
cgttgaggac ccggctaggg tggcgggggt gccttactgg ttagcagaat gaatcaccca 40500  
tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct gcaaaacgtc tgcgacctga gcaacaacat 40560  
gaatgggtctt cgggtttccgt gtttcgtaaa gtctggaaac gcggaagtca gcgctcttcc 40620  
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 40680  
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 40740  
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 40800  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 40860  
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 40920  
cctgttccga cctgcgcgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg 40980  
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 41040  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 41100  
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 41160  
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 41220  
tacggctaca ctagaaggac agtatgttgg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 41280  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 41340  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgate 41400  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttgggtcatg 41460  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaataca 41520  
atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 41580  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 41640  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 41700  
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 41760  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 41820  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc 41880  
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 41940  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggtta gtccttcgg tcctccgatc 42000  
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat 42060  
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 42120  
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat 42180  
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 42240  
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 42300  
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 42360  
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcatactc 42420  
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 42480  
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgcg gcacatttcc ccgaaaagtg 42540  
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 42600  
acgaggccct ttcgtcttca agaattcgcg gccgcaatta accctcacta aagggatccc 42660  
tatagtgagt cgtattatgc ggccgcgaat tctcatgttt gaccgcttat catcgat 42717

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 34071

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:insert  
d'ADN du cosmide a26G1 - brin codant

&lt;400&gt; 114

```

actgcagtgc ccggaatcgg cgggtggactt acagcagccg ctggtgcgta tgggattgga 60
ctcgtcatg gcggtgcaat tacgcaaccg gatcgatacg gatctgcgcg tcttgctgcc 120
catggtccga tttctagacg gccccagcgt tgcggaactg gccagggatc taagcgatct 180
aagcggcctc agcgaacgca cgacgggtggc gccggaacct gcggcgcagg cctcggttcc 240
tgccctctcc taccctctca gcgccggcca gcaggcgctt tggtttattt accgaagcgc 300
gccgaaagt cccgcataca acatcgcggtg gatcgcgcg gcgagaggcg ctttcgatcc 360
gcaggcggtg cgccgttcgc tgcaggacct ggtggatcgt catccggcgc tgcgaacgac 420
gattgcggag agtggcggcg caccggttca aacggtccac agcagcgctc cgggtggattt 480
cgaagtgatc ccgtgttcgc cggacgatga ggcgggtgctg atcgacggcg tcttccacgc 540
jcccttcaat ctccgcaaaa actgtttccg ctccgctctc ctggtgcagt cggggaagga 600
tcaggttctg gccatcgtgg tgcacacat cctcgccgac ttctgggtcac tgctggtgat 660
ggtggatgaa ctccgcagta tctacctcgc gaggacagct ggcggtccgc ctgtcgcgcc 720
gccggtcgcg agcttcgcgc ctttcgctccg ctggcagaac gaactgttgg ccggaaccga 780
ggcgagcgcg ctttggaact actggtcctc gcagctttcc ggccagcttc cggttctgaa 840
tctcccgctc gatcgtecca gtccgcgggt gcagagtttc cggggaaact ctcactcgtt 900
ccgaatcgaa ccgcgcgtga ctgcgaaact gaaggcgctc gcgcggcggc agaacgcgac 960
gctgcatgcg acgtgatgg cggcggttca agtgccttct tcccgttggga cctcacaaga 1020
agagatcctg accggcaccc tcaccaacgg tcggacgcaa ccggaattcg ccgatctcgt 1080
cggatacttc gtgaatcccg taatcctgcg aggagaactt tcaggcgatc cggatttcaa 1140
tacggtgctc gcccggtatc ggcaaacgct tctcggcgcg atcgagcacc aggagtaccc 1200
gtatgcccg atcgtggagc ggttgggtcc cggactgcgg gttctattcg tgctccagca 1260
gcctcatcgc attcccgaat ccgtgccgtt catgttgggt cagtcggcg gtgcgatggc 1320
ctggggcgag ctacactgg agtccctggc gatgccgctg cgacagagcc ggtttgacct 1380
ggatctgatg atggtcgaaa ccgatggagg cctctccgcc tttctgcaat acaacacgga 1440
catttttgat gctgccacga ttgaacgtct ctcttgac ttcccgctgc tgctggaagg 1500
aatcgcgag aatccgcct gtccagttgt cgatctaccg ctgctgacaa cccgggaacg 1560
atccagctg ctggaagagt ggaatgcgac cgccgcggaa tcccgtccc aatgcgtgca 1620
cgagctgttc gaagctcagg tggagttgac gcccgacgcc atcgcggtga gcttcggtga 1680
gcagaatctg acatatcgcg aactcaacgg gagcgccaac cggatcgcg actatctccg 1740
ctcgcgcggc gctggaccgg gcgaaatggt tggcatccat gtcacgcggg cgctcgaaac 1800
cgtcgcaggg ctggtggggc tcctgaaggc cggcgcggcc tacgttccgc tggaaaccgga 1860
atatccggcg caacgtcttc ggctgatgct ggaagagacc aggcgggtcg ttgtgctgaa 1920
tgtcacgga tcggaagtat ggacgcagcc cgacaccaat ccgaacccgc tcgcgactcc 1980
cgccgatctc gcctatgtcc tgtacacct cggttcgacc ggccggccga aaggcgtgca 2040
aatcacacac caggccgtcg tcaattttct ttcgtcgatg cggcatgagc cgggcattcag 2100
cgaccgcgat acgtgctcg ccctcacgac gttcatgttc gacatttccg cgctcgagat 2160
ctttttgccc ttgagcgccg gcgcgcgcgt cgtggtggcg aaccaggaga cggccgtcga 2220
tgggtgagagg ctggcgaggg aactcgcgcg cagcaaagcg acaatgatgc aggcaactcc 2280
cgccacctgg cgtctgctgc tcgcatccgg ctggcccggc gaccgcgcgc tgacggcgct 2340
ctgcggcggt gaagcccttc ctcgcatct tgcgaccgg ctctgcaac gaaccgcggc 2400
gctatggaat ctttacggac ctaccgaaac gacaatttgg tccgccatcc aacgggtgac 2460
gacaggtgac ggaccgggtt cgattggccg ccccatcgca aacactcagc tctatgtgct 2520
tgacgatcgg atgcagccc caccatcgg tgttgcgggc gaactgtaca tcggcggcgc 2580
cgggctcgcc cgtggatacc tgaatcgtcc ggaactcagc gcggacaagt tcgtcgccaa 2640

```

ttcggttcgac cctcatggca ctcggttgta tcgcacggga gatctcgccc gccgccaacg 2700  
cgacggcgcg ctcgagtatc tcggccggat cgaccaccag gtgaagatac gcgggttccg 2760  
catcgaaacc ggcgagatcg aggcgcggt ccgcagtcac ccggcggtcc gacatgctgt 2820  
ggtcaccgcc agagaaaatg acgcggccgg taagtatctg gcggcctaca ttgtccccct 2880  
tgctgacggg catcgcgcgga cggcagccgc cgacacattc cacgaccgag tcgagtccga 2940  
gcacgtgacg cagtggcaat ccgtctggga caccacatat gaacagaatg cgccgaacgc 3000  
ggatccggag ttcaacatcg tcggctggag aagcagtgtt accggagagc cgattccagc 3060  
tgccgagatg cgggagtggg tgcaggattc cgtcgatcgc atcctggcct cgcgcccgcg 3120  
tcgcgtgctc gagattgggt gtggtacggg actgctgctc ttccgcgtcg ctccccactg 3180  
ttcggagtac tgggccaacg acttttcgca gaaggcgctg gactacatcg ccgctcacgc 3240  
ggaccgcacc ggcctggcaa atgtccgcac gttccggcag gcggccgacg acgcgtgcga 3300  
gatcgacagt cgctcgtgcg atgcggttgt tctgaactcc gttatccagt acttccccgg 3360  
cgaagcgtat ctgcggcgcg tgcggccga ggcgggtgct gtggtcaaac cgggcgccat 3420  
cgtatttgtc ggcgatgtcc gcagtctccc gctgctggag acgttttacg cttctttaga 3480  
agttcagcgc gcacccgcgt cgttgacccg gaatgagttt cggcaacgcg tgcgttcgct 3540  
cgctcgcag gaagaggaac tcgtggtcga tcccgcgctt ttctttgctc tccgcgaaca 3600  
gattccggag atcggccgga ttgaaatcct gccgcgtcgc ggccgggtcgc ataacgagct 3660  
gaccgccttc cgctaccagg cgatcctgca tatcggatcg cgggaagcgg aggagccgga 3720  
atcggtatcg aggcgttgcc agaccgcggc cgaataacgc agagtactga cggacgctca 3780  
gccggagtgt gccgcattta ccgagattcc gaacgcacgg ttgaccgccc aaagcgccat 3840  
tgtgacctgg atgaacggtg acgaagctcc agagacactc ggggagtgtg gggaccggct 3900  
gcgccagacg tcgccttccg gcgtcgatcc cgccgatcta tggcgtatgg acgaagacct 3960  
gccgtaccgc gtggcaatcg actggagcag tcatgggcca cacggacgct tcgacgcgac 4020  
cttctgccgt gcggcgggccg gtccgcccgc tcccgtccg cgacgcgcgc tggccggccc 4080  
gtatacgaac gatccgctgc gagccgtcta tacgcgcacg gttgtgccgc agttgcgtac 4140  
tcatctgaag gagaagctgc ccgactacat gatcccgaac gcgtgggtcg tgctccacga 4200  
aatgccgctg acgcccacg gaaaaatcga ccgtaacgcc ctgcccgatc ccgagcccag 4260  
ccggcgagcc cacgccgaag cattcacgcc tccggaaact ccggtggaac aggtactcgc 4320  
ccacatttgg ggcgaggtgc tcggcatgga tggcatcggc gtccatgatc acttcttcga 4380  
ctctggagga cattcgctgc tggtcacgca gatgatcgcc cgcgtgcgcg acatgctcca 4440  
cgtggaagtg ccctttcgaa ccgtgtttaa cgccccacg gttcgaggct tcgccgtcgc 4500  
tattcaggac ggcgtagacc caggatgggc aaggcgagcc gccgatttgc tgatcgctgt 4560  
ttcccaaatag tcagatgttc aaatcgagcg tatgatgagc gccgcccag actaggaaca 4620  
cagcgggttg taatgcagaa ttcgctcgcca aataccatag acctctcgct cgcccgcgc 4680  
caattgctcg accgtctgct gcaggaaaac agccccgaac atcgcatccc gcggcgtaaa 4740  
aaccgggatg ccgcaccctt gtcgtggcc cagcagcggc tttggtttct ccactcagctc 4800  
gaccgggatt ctcccgccta caacattccc atagcgctgc atatccgagg tccgctggat 4860  
attcgcgtcc tcctgcggag tctggaggcc gtggtgcagc ggcacgagag cctgcgcagc 4920  
tgcatggcg gtgtggatgg agaggcgcg cgagccctcc tggcgcgagt gacactggaa 4980  
cttccgggtg ttccaggtga cggaaatcgca gaagcgcggc aaatggcctt gcgtgatgcc 5040  
cagatcccgt tcgacctgcg aaaacccccg cttctgcgga ccaagctgat ctgcctcgat 5100  
gacaagcagc agattctcct gctgacgttg agccacatca tcgcggatgc gtggtcggtc 5160  
gagacgttcg tccgcgacct gacgcgatcg tacgaagcgt tcgtgcaggg gcggccatcg 5220  
ccgctcatgg aactgccgat tcagtatggc gactgggccc tccatcagca gacgtcgctg 5280  
aaccaaaccg cgcagcagta ctggaagaaa cagctgtcgg gcaccttgcc tttcctcgac 5340  
cttcctaccg atcgcccccg gcccgcgcag cagacctggc ggggcgcgct ggagaccaca 5400  
gccctcggcc gtgatttgac cgatggactc cacgcgtttg ccttgcgta aggagcgacg 5460  
gtgttcatga cggcaatcgc ggcgtttcag gtgctgctgc atcgctatac cgcgcaggaa 5520  
gacatcctta tcgggggtcc agtcgcgggc cgtacacaac gagaaacgga aggtctcgtc 5580  
ggttggttcg ccaacatgat cgtcctgcgc ggcgatctgc gcgacgatcc gtcgtttcgc 5640

agtcttctcg cccgcacccg cgacaccgct ttgagcgccc tctctcatca ggactttcct 5700  
ttcgaacgcc tgggtgagga actgcatcct ccgcgggacc tgagccggtc gcctgtattt 5760  
caggtctcct tcgcgctgct gcccgatgcg ccggccatca ccgtcatgcc tgggctcacc 5820  
atctcgcgcy agtacatgca caacggcgga tccaaactcg acctcggcgt gaccctcgag 5880  
ccatccggcg atggactgat ggcgtccgcc gaatacaaca ccgatttgtt cgatgcggca 5940  
accatcgctt ccctgctcga tgcgtaccga accctgctgg cgagcgtggt gacggatccc 6000  
gacgtccgca tttcaaccgc tgcgtgttg tcccccgcg tccgaagccg gatgctcgag 6060  
cagcacaatg cgacacggcg cgatgccggt ccgaacgggt gtgcgcatga actggctgaa 6120  
gctcaggcgg aacgcactcc gcacgccgtc gccgttgtct tcgaagacca tcagttgacc 6180  
tacgccgagc tgaatgcgcy ggccaaccgc ctggctcatc gtctgagcgc atccggcgcy 6240  
ggcccgggaa agatcatcgc tctggcgatg gacgcctcgc tggagatggt gattgcgctg 6300  
cttgcgattc tgaagtccgg cagcgcgtac ctgcctctcg atcccgcgca ccccaaggat 6360  
cgtctcgccc ggattctcga tgaagtgcaa ccgcacgcgg tcctcacgca ggaggcgggtg 6420  
gctgagatga tggcgatgat ggcgatgatg gcggctcgcc tcgaaccaga agctgcgaat 6480  
ctcgtcagcy gcagcaagcc cgacgatctc gcctacatca tatatacctc cggatcgacg 6540  
ggcgacccga agggcggtga gatccgccac tcgtcgctag tcaatctgct gcgtccatg 6600  
cagcgcgagc cgggtctgac agccgcgatg gggctggctg ccgtcaccac cgtgtcatc 6660  
gatattgccg gactggagat ctggctgccg ttgatcaccg gcgcccgcgt catcgtcgcc 6720  
acccgcgaga tcgtggttga cggcgagcgg ctccaccacc tgctggataa gtcgggcgt 6780  
acggatcatg aggcgacccc gagcggttgg cggcaattgc tggattcggg ctggaagccg 6840  
ggtaaaggct tccgtgtttt ctgcggcggt gaagctctgc cgccggaact ggcgcgccgc 6900  
attctcgata gtggcgtaga gctgtggaat ctttacggac cgacggagac caccatatgg 6960  
tcggccgtgc acaagacaca aagactgggt gcctccgata gcacgtgcc gatcggccat 7020  
cccatcgaca acacgcagtt atacatcctg gattcgcgca tggagccggt tccccccgga 7080  
gttcggggag agctgtacat cggaggagcg ggactggcgc ggggctatca tcgcaacccc 7140  
gagctcacgc gtgagaaatt ccgcgagtggt cgtgatcgag gacgcattta ctctaccggc 7200  
gatctggctc gctaccgttc cgacggcgca gtcgagtgc tgggacgagt cgatcgccag 7260  
atcaagctgc gcgggtttcg catcgaaacc gccgagattg aggccgcgat cgagacgcac 7320  
attgccgtga agcaggcgat tacggtcgtg aaggacgatc ggctgatcgc ctatctcgtt 7380  
ccggcaacgg gcgacgtgcy cgatctgcag agcgatttgc ggtcgtggct ggcaacgcgc 7440  
cttcccgat tcatgatccc ctccggcgtt gtcagcctgt cctcccttcc gctgacgccc 7500  
aacggcaaaa tcgacgcgaa cgcgcttccc ggtttgccc caacgcgggt tgctgctcgc 7560  
agccgatgc gcggcgatgt ggtggagacg attgcgtcca tctggcgta agttctgcgc 7620  
gtggagcacg tcgactatcg gcagaacttc tttgatgtcg gcgggcactc gctaattgctc 7680  
acacgggtgc gcggactgct cgaggagcgc ctgggggtga cgctctccgt cgtcgatctg 7740  
ttccggcata cgacgatcga gtcgcttgcc ggctggcag aaaaatccga acccgccgt 7800  
gcggaacctg cggctgcggt cgcagaagat cggatcgag ttatcgggat ggccggccgg 7860  
ttcccgggg cgcgcaatgt ggaggagttc tggcgcaatc tgcgcgacgg tgtggattcc 7920  
atcgccaggc tttcgccgga agatctgctg gcgggcggca tcagcccgga ggtcttccag 7980  
gacccgagct acgtgccggc caagggctctg ctggacggca tcgagttttt cgatgccgcy 8040  
ttcttcggct acagtccgcy cgaagcggag atcatggacc cgcagcatcg cgtgtttctc 8100  
gagtgcgcyt ggggaagcgat ggagaacgcg ggatatgcgg cgcaagcta taagggttcg 8160  
atcggcgttt tcgcgggatg cggcgtcaat acctacctgc tgaacaacct cgccaccgcy 8220  
gagccgttcg atttctcacg cccctccgcy taccagctgc tgacggccaa cgacaaggat 8280  
ttcctggcca cgcgtgtctc ttacaagctg aacctccgcy gggccagcct gacggttcag 8340  
acggcggtgt ccacctcgct ggtgtcgggt gtgatggcat gcgagagctt gcagcgcgcy 8400  
gcctcggaac ttgccttggc cgggggagtt gccatcaatg tccgcagtc cgtggggtac 8460  
ctgcaccagc cgggcatgat cctgtcgccc gacgggcgt gccgcgcct cgatgagtc 8520  
gctcaaggca cgggtgccggg caacggcgcy ggtgtggtcg tcctcaagcy cttgagccgc 8580  
gctctggccg atggcgacac gatctacgcc gtcattcgcg gagcggctat taataatgat 8640

|             |             |            |            |             |            |       |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------|
| ggcgccgagc  | gcatgggggtt | taccgctcca | ggtgtggacg | gtcagacgcg  | attgattcgg | 8700  |
| cgcactcaag  | agatggcggg  | cgtgaagccg | gagtccatcg | gctacatcga  | ggcccacgga | 8760  |
| acagccacgc  | cgctcggcga  | tccggtggag | atcgccgcca | tcgctgccaa  | ctttccgaaa | 8820  |
| aacggaagcg  | gcgatgtgta  | tatcggatcc | gtcaagacca | acatcgggtca | tctagacgtc | 8880  |
| gcggccgggtg | tggccgggct  | gatcaagacg | gtgcttgccg | tccatcgcg   | ccagattcct | 8940  |
| cccagcctga  | atttccagcg  | tccgaatccg | cgaattgatt | tcgcaaacac  | tccgtttcgt | 9000  |
| gtgagtacgc  | ggctgctcga  | ctggcccgc  | ggaaagaccc | cgagacgagc  | ggcagtcagt | 9060  |
| tcgttcggga  | tcggcggcac  | caacgctcac | gtgattcttg | agcaagcgcc  | gccggtgacg | 9120  |
| ccggccgcag  | ctgcgcccga  | acgatccgca | catgtgcttt | gcctgtccgc  | caatacagac | 9180  |
| gcggccctcg  | aagaactggt  | gcgctcgtat | cgcgcccata | tggacaacca  | gcccggtttg | 9240  |
| tcgttcggcg  | atgtcgcatt  | cacggccaat | gcaggcgcg  | tgcacttccc  | gcaccgtatc | 9300  |
| tgcatttgtg  | ccgggtcgag  | cgacgaggct | cgccaacgac | tgacggaggc  | acgacggggt | 9360  |
| cgcacgccc   | agacgcgccc  | caagattgcy | tttcttttca | ccgggcaagg  | tgcgcaatac | 9420  |
| gcgggcatgg  | gccgccagtt  | ctacgagtcg | cagccgggtg | ttcgcgccgc  | catggatgaa | 9480  |
| tgcgcagctc  | tgttgaatgg  | acggctcgat | ctgccggcgc | tgttggccga  | tgacgcgttg | 9540  |
| ctcgacgcga  | ccgcggcgcg  | gcagcccgcg | ctgtttgctt | tgcagtgggc  | cttggcgag  | 9600  |
| ttgtggaagt  | cctgggggtg  | gacgcccgc  | ctggtgatgg | gacacagcgt  | cggcgaatac | 9660  |
| gcggcgcggt  | gtattgccc   | cgccgtcagc | ctgccggatg | cgctcgggctt | agttgccgaa | 9720  |
| cgcgccgggc  | tcacgcagaa  | cctgccggaa | ggtgcgatgg | ctgcgggtcag | cgccggcgag | 9780  |
| cagcgctgtg  | ccgcagcgat  | cacctcgcg  | gtctccattg | cgcccatcaa  | cggaccgcgt | 9840  |
| gaggtcgtga  | tttcgggtgc  | gccgcaggat | attgagagcg | cgctggcaac  | tctacgtgcg | 9900  |
| gagggcatca  | aaacgcagat  | gctggccggt | gcgcgcgcct | ttcacagctc  | gagcatggat | 9960  |
| ccgattcttg  | cggacctgca  | acgccggggc | gcggcgatcg | cgtggcgcaa  | tccttcgatc | 10020 |
| ggcttggttt  | cgaacctcac  | gggcaaactg | gccggcgagg | gacagctggc  | gaatccgctg | 10080 |
| tactggcgag  | atcacgctcg  | aaaccctgtc | cgtttcgccg | acggtatcca  | aacgctcaag | 10140 |
| gacgaaggct  | gcgacgtggt  | tctcgagatc | ggtcctaagc | cggttctact  | cggcatgggc | 10200 |
| caaaagtgcc  | tgcccgcagca | cgccaagcag | tggctgccgt | cgctgcgtaa  | aggccgcgat | 10260 |
| gagtgaggaga | cgattctcag  | cagtgtggcg | acgctatatc | agggtgggtt  | cgacatcgat | 10320 |
| tggcaggagt  | tcgaccgtcc  | gtattcgcg  | aggcgtgtcg | ccctgccggc  | ctatcctttc | 10380 |
| gagagacgcc  | gccattggat  | cgagcggagt | tcagaccgg  | aacctgtagc  | ggttgcgagt | 10440 |
| ggtctcgtcg  | ggtgccggct  | gtcgtaccg  | gtggcagacg | ttatcttcga  | gtcgaaacta | 10500 |
| tcgacgggctt | cgcctctact  | ctcagaccac | cgatattacg | gttcgggtgg  | ggccccggcc | 10560 |
| gtgtacttcc  | tggccatggc  | gctcgaggcg | tcggcggagg | tgtttggcgc  | cgcccggcac | 10620 |
| acgctggaaa  | acgtgaactt  | cgcgccacct | ctgacctttt | cagcggagcg  | cgacacggct | 10680 |
| gttcagctcg  | tgtttcaca   | gagcgatgac | cggcattgct | cgttccgcat  | actcagcttg | 10740 |
| tccgacggct  | cgtggaactt  | acatgctgcc | ggcaatattg | ccgcccacgc  | tgggtgtcgt | 10800 |
| cccgtgcccc  | gactggtcga  | tgaacgcggg | cctgcgggtg | atggagacac  | gtactattcg | 10860 |
| ctgctgcgcc  | acctcgagat  | agaactgggg | ccgagctacc | gccgcataca  | gcgcattcat | 10920 |
| ttcgggtgaac | aggaagcgct  | ggccgcgatt | gattccgcaa | cgccgctcaa  | tccccgttgt | 10980 |
| gaattggcgg  | aagccggcct  | gcaattgctt | agcgccgcgg | cgagtcccgc  | gcttgcggat | 11040 |
| ggcgccgaac  | atccgatatt  | cgtcccgctc | ggtatcgatc | gcgtttgttt  | ttacggcagc | 11100 |
| ctggagggcg  | ccgtatgggg  | ggccgcgcaa | attctccggc | attcgccgga  | cggttttacc | 11160 |
| ggcgagggcg  | agttgctgga  | ctcgaggggc | tgcgttctcg | gggaacttca  | gggctgagat | 11220 |
| ttccggcgcg  | tactcgcg    | atgggcgcag | cgctcggaac | ggaagcccg   | attgtatgag | 11280 |
| gtcgagtggc  | ggcccgaacc  | gctccgccag | ccttcgcgaa | cgctacagcc  | tggggcatgg | 11340 |
| ctgatcctgg  | ccgacagtgg  | cggcgcggcc | cgcgctctgg | cagatgcgct  | cacagctcag | 11400 |
| ggcgagatgt  | gcgttaccgt  | gccgccagcc | ggcgagtaca | tgtccctagt  | cggtgagcgt | 11460 |
| gactggcgcg  | ggatcgtaaa  | cctgtacagt | ctcgatgatt | atgagctcgg  | ctgccgcagc | 11520 |
| actctggccc  | tgggtgaagtc | cctgaagtcc | ggtccgcggc | tatggctggg  | aacggccggc | 11580 |
| gcgcaggcga  | ccagtgcggt  | gcacaatccc | atgcaggccg | cgctctgggg  | cttcggccgg | 11640 |



gtgatcgcgc gcgagcaccc ggatctgtgg ggcgggctca tcgatctgga tcccgaacgat 11700  
gcgcattgctt cggcgcccg cgcggcccg cagatgcgtg atttcgacgg cgaagatcag 11760  
tcggcgtgga gaagcaaccg gcgctacgtg ccgcgactga cccgccgacc cagcgcgcga 11820  
gcggcagtcg gtctgggttc gggcgcgact tatttgatca ccggcgggct cggagccctg 11880  
ggacttacag tcgcgaaatg gatgggtggag cacggcgcca ctgcgctcgt gctggccggg 11940  
cgccggcctc caaacgagga gcagcagcgc gtgctgcaac agattgggtgc gacggcagag 12000  
acggtcgacg tcagccggga agaagaggtc gcggatctca ttcgccgcat ccacaccgaa 12060  
acgtcacccg tcgcggcggt tatccatgcc gcgggtgtgc tggacgacgg cgtactgctg 12120  
aatcaggact ggacgcggat cgcaagcgtc atggcgccga aggcggaagg cgctgtacac 12180  
ctccatcatc acaccgcga tctgccgctc gacttcttcg tgcctcttcc atcggcatcc 12240  
tcgctcttag gtccctgccg gcaggcaggc tacgcccgcg ccaacgccgt tctcgatgcg 12300  
ctggcgcatc accggcgcg actgggtttg ccggcgacca gcattaaact gggcgctgg 12360  
tcgggagccg gaatggccgc gcgcaccagc cagtcgatgg ccggcggtgg gagcctctcc 12420  
gtggacgagg gtctacacat tctcgaggcc gtccctgcgt aatgccccat tcagattgcc 12480  
gcgctaccgg cgggctcgat taccggcgag ttgctgcgtc ccgcgcgct gccttcacct 12540  
baactgcga cccgcttgaa cgaagccaca cccggcgag gcgaagccat cctcattgct 12600  
cacatcaggg agtcactggc gcgctttgtc ggcctgcga cttccacacc gctcgatcca 12660  
cagcagcctt tgggtgaact gggactcgat tcgctaattg ccatagaact tcgcaactcg 12720  
ctctcccaat cactggggca gcctttgccc gcgagctcgc tgttcgacta tccgtcgcct 12780  
gatgcgatcg tcagttacgt gctccatgcg gtatttccac ccgaagcatc accggtggaa 12840  
gcgcgggagt ttgagaacct cgccgcgaa gaactggaag cgctgctcga ttcgcggctg 12900  
gcgcaggtcg accagtgggt ggagacgcaa taaacatgag cgggtcagac gatctcagca 12960  
agcttcgccg cgccgtgatt gcgctcgaca aggtgcagaa acgcatcgac cagctggaga 13020  
gcgcgcgcag cgagcccatc gccctcatcg gcggggctg ccgcttcccc ggcgcattcca 13080  
atctcgatgc ctattggtcg ttgctgcgcg agggcgcgag cgcggtacgt gaagtccac 13140  
ccgaccgctg ggacatcgat gcctactacg atccggatcc cggcgcgacg ggccgaatgt 13200  
acacgcggta cggcggttc atcgatcagg ttgaccgttt tgacgcccgg ttcttcggca 13260  
tcgctcccg cgaggcgatc agcctggatc cacagcagcg gctgcttctg gaagtcacct 13320  
gggaggcgat cgagaacgcc gggcttccac ccgaccggt ggcggggagc cggaccggcg 13380  
tcttcattgg gatcttttcc aacgattatt acaacctgca aatgcgcggc ggggatgcgc 13440  
atatcgacgc gtacaccggc acgggcaata cggccagcgt tgccgcgggg cgtctctcgt 13500  
acatcctcgg gctgcagggc ccgaacatgg cgatcgacac ggcattgctc tcattcgctg 13560  
cgcggtgca ccttgccgtg cagagcctgc gctcaggtga aagcgacctc gcgctggcg 13620  
gcggcgctca tctgattctc tcgccggatc ggacgatcta cttctgcaag ctgaaggcga 13680  
tggcagccga cggtcgctgt aaggcattcg atgccgcagc agacggctac gtccgcgggtg 13740  
agggctgcgg tgtggttggt ctgaagcgac tctccgacgc gctgcgcgat cgcgatccgg 13800  
tgatggcggt gattcgcggc acggcaatca accaggacgg acgcagcaat ggactgacgg 13860  
cgccgaacgg gcccgcacag gaagccgtga tccgccaggc tgtgggagac gcgcgcttgc 13920  
agacgctgga tgtgagctat gtcgaggcgc acggaaccgg cacgcgctg ggcgatccca 13980  
tcgaagccgg agcccttgcg gccgcgctgg gagcgggggc caccaacggc aacaagctga 14040  
agctcgggtc ggtgaagacc aacttcggcc acctcgaggc ggcagcgggc gtggccgcac 14100  
tgatcaagggt ggcgctgatg ctgcagaacg aagccattcc gccccatctg aatctgacca 14160  
cgccagccc gcacatcgat tggaaacgc tccccctcga aatcccgga cggtcaccc 14220  
cctggccggt tgcaccggc gggcggcgcg tcgccggcat caactcgttc ggcttgagcg 14280  
gtacgaatgc gcacgtgctc atcgagcagg cgccgaaca ggcgcgtcc agtacgcccg 14340  
caccgtacct gcttccgcta tcggcgcgca gtccggaggc gctgcgtgat ctggcgcgcg 14400  
cataccgcga cgtggtgaac gacaacccc cgcacacctg ctacacggcg tgcgctcgcc 14460  
gcacttcata cgaacaccgc gcggcattca ccgggacgaa cgcgcaggac ttgatggccg 14520  
ggctggacag ttttctggcg ggcaaccgga accgcgatac cgccacaggt tttgtgcgc 14580  
gcggccagaa gcgaaaagtc gttttcgttt tgccgggaca aggatcgcg 14640

tgggcccgcga cctgatggct tctgaaccgg tgttccgtgc cgccatcgaa gagtgcggcc 14700  
gcgccatgca gccttacgtc gactgggtgc tgacgcaaga gttgcagggg ccgctcgacc 14760  
gcacgcagct gattcaaccg gccctgttcg cagtcggggg cgcttgggcc ggactgtggc 14820  
gccattgggg aatcgagccg gacgccgtga tcggccacag catgggcgaa gtgcgaggcag 14880  
cgcacattgc aggtgcgctg actctcgatg aagccgctcg ggtgatttgc ctgcgcagcc 14940  
ggatgctcgc cggagtacgc ggccagggag aaatggctgt cgtggaatta gcgctggacg 15000  
aggccatcgc tgccatcgcc gggcgctcgg atcgggtctc gattgccgcc agcaacagcc 15060  
cgcgcagcac cgtcctgtcg ggcgacagcg cagctctggg cgaactgctg cgggaactgg 15120  
aggcgaaaga cgtcttctgc cgtcgcgtga aagtggacat tgcctcgac agccatctga 15180  
tggaactccgt gtgcgcggcg ttgccgggcg tgggtgggag gcttcagccg cggccggccg 15240  
cccttggeat gtactccacc gtccacggcg cagcgattag cgggtgaagag ctggtttctg 15300  
cgtactgggc tcgtaatctt cgccaaccgg tgatgctgtc gacggccgtc gccgcagccg 15360  
cggcgggtgg tcatgatgtg tttctggaac tgagtcccca ccggttggtg gtccagccga 15420  
tccaggaaac gtcgagat cgggcagcga ttgccgctgc ctggttgcg cgcgatgaag 15480  
acggaaacct cgcactgcgc cggacgctgg gagcgctgct gactaacgga gtcactccgg 15540  
actggctcgc tatttatccc aacggcggcc aaactcgccg gctgcccaac tatccctggc 15600  
agcgtgagcg ttattggatc gatatccgtc cgccgcaggt cgagtctcag gctttgcctg 15660  
gccggcggat ccgctcgccg ctgccggaga tgcagttcga gtccactgtg gaggcgaaag 15720  
atttcgcgga tcaccggctg cacgatgtga tcgtgactcc gggagcgtgg cacctggcaa 15780  
tggcgctcgc cgctgcgcgc caaggtctcg gcgcggggcc tcaccatgtc gaacacgtgt 15840  
cattgacggg cgcgctgacg ctgccggaaa acgatgctgc caggcaggtt caactggtac 15900  
tccgtcatga agagggcgcc ggagcttcct tccgcatcta cagccgcgag gattcctgga 15960  
agctgcacag cgaaggcatg ctgcaggcgg gcgattccac ggcattccatc gatctggatg 16020  
cgattcgccg ccgctgcacg gcggagctca cagccgatgc cttctattcg cgactgtggg 16080  
atcgcgcta tcacttcggt ccaccttcc gaaccatcgg ccccatctgg cgcggcaacg 16140  
gtgaggtgct ttgtcgcgtg gacattccgc tgacggaaat gcagacgac gactgctgtc 16200  
tgcagttgcc cgcggccctc gtccatcacg acgatttgaa agatgtgcat gtgccggtag 16260  
gtctggaccg attctcgtc gctgaagtgc ccaactggccc ggtctgggga tacgcggtct 16320  
tgcggccgga ttccacgggtg gatgtccgtc tcgtcacggg caccggcagc gtggtggcgg 16380  
aattggtggg gctgcagtcg agagtcgccc atagcggcca gctcggcgaa tcggagattc 16440  
ccacctggac ggtgcaatgg accgcgtcgg ttgcgcggcg cgatgccaat gccggcaatg 16500  
ctggcggaac ttggctcgtc atcggcgagc cggcgattgc cgagactctg caaaagcgcg 16560  
gccaacctg ccgcacggcc gatacgtgct cgggtccgcc gtgccgtcaa attgtgtact 16620  
gtccctcgcc gcgcacgac gacctgcttt ccgtattgcy cagcatcgtg caagcgggct 16680  
ggcctgagcc gccgcgctg tggctgctga cgcgcggatc tgccgcggtt ctcaactccg 16740  
acaaagatat tgatattcga caagcctggc tgcacggaat tgggcggacg attgcctatg 16800  
agcatcccga gctgcgctgc acgctcgtcg atctcgatgc gcacagcaac gactgcgggc 16860  
atctcgcgac gctgatgctg tcgaatatcg cagaggatca agttgcgac cggaaggca 16920  
cggtatgggc gccgcgcctc agtcttcaca agatcccatc cgcacccgat gtggcggttc 16980  
gtgccgacgc aacctatctg atcacgggcy ggcctggcgg actcggactg caggtggcgg 17040  
gatggctcgc cgccgcggga gcgcgccatc tcgttctgct gggacgcagc gagcgtcctc 17100  
ggccacaact ggaaggtgtc aacgtcaaga tcatccatgc ggacgtggcg gaccggcagc 17160  
agctatcgga tgcgctcgcy atcatcgatc gcgacatgcc gccgttgcyg ggcgtgttcc 17220  
atctggcagg cacgctggcc gacggcatgc tgctcaatct cagcaccgaa cgcttcgaag 17280  
ccgccatggc tccgaaagta gccggcgcggt ggaacctgca cgaactcacc gccggccggc 17340  
cgctggatca ttttgttctc ttctcttccg ccagcgcgac agtgggatct cccggccagg 17400  
gcaactacgc cgccggcaat tcatttctcg acgcgctggc tcactcgcgc cgcgcccagg 17460  
gtcttcccgc cgtcagcatc gcgtggggac cgtggacaca ggttggtttg gccgcacagg 17520  
cgaaccgcgg agaccgtctg gccgcgcgcy gcactctcgg tattcaaccg caacagggat 17580  
tgcgcgcgct ctacaaagca ttgacgcaga ttcggccgca cgtcgtctgc atgaacttcg 17640

|             |             |             |             |             |              |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------|
| ggccagcaa   | gccatcgccg  | tcatggacgc  | agatgtccgg  | acggtgcagg  | ccgatgtttc   | 23700 |
| tcagcgcgat  | gaactcgagc  | gcgtgatctc  | ttccatcgat  | cgattgcgcg  | gcgtgattca   | 23760 |
| tgccgcagcc  | gttctcgacg  | atgcgctgct  | actgaaccag  | acggaagcgc  | atttccgcaa   | 23820 |
| cgtgatggcc  | gcgaaaatcg  | acggtgcctg  | gaacctgcac  | ttgctcacc   | gcgactgccc   | 23880 |
| gctcgatcat  | ttcgtgctct  | tctctccgc   | tgcaggactg  | ctgggcgcgc  | ccgcccagg    | 23940 |
| aaactacgcg  | gccgcgaacg  | cctttcttga  | cgcgctggcc  | tactaccgga  | aggcccaagg   | 24000 |
| cctgccggcg  | ctgagcatcg  | gttgggggtg  | gtggctcgag  | gtcgggctgg  | ctgccgcgca   | 24060 |
| ggacaatcgc  | ggatcgcggc  | tggctttgcg  | cggcatggaa  | aacctgacgc  | cgcaacacgg   | 24120 |
| cctcgctatt  | ctggaacagc  | tgctgaacag  | ctcggcttgc  | cacgtcgccg  | cgatgccc     | 24180 |
| caatgtccgc  | cagtggcggc  | agttctatcc  | caaggcggcg  | cagtctgcac  | tgttcgagct   | 24240 |
| tttgcatgac  | gacgcggcga  | gcgaagccga  | tgcgccaaac  | gcgttgcgcg  | cgcggctgca   | 24300 |
| atcgcccgag  | cctcagaccc  | gcaggacatt  | gctcgaagaa  | catctacagc  | agcagctggc   | 24360 |
| gcgcgtgctg  | cgcacgcact  | ctcaaactat  | cgatcccctg  | cgcgcgtga   | aggaactcgg   | 24420 |
| cttcgatctc  | ctcatggccc  | tggagtctcg  | caaccgtctc  | gaactcacac  | tgggtctcac   | 24480 |
| ctccccgcg   | accctgattt  | ggggtcatcc  | cacgctggcc  | ggctctgccc  | cgcacctggc   | 24540 |
| gtcgcaaatg  | ggactgccgc  | tggctgaagc  | gcaggccgcg  | gctgctgcgg  | aaggagacag   | 24600 |
| ccgcgccatg  | aaaactgcac  | tcagcgggtt  | ggacgacatg  | tcggaagaag  | cagccgtggc   | 24660 |
| tgcgctccga  | ggagcaaggt  | cgtgagggaa  | aaaattgcgc  | ccatgtcgtc  | gggtcaaaactc | 24720 |
| gcgctattgg  | cgcggaacat  | gcggcaaaac  | atcgcaggct  | tcgacctgg   | tcacgccgaa   | 24780 |
| cccatcgcca  | tcgtcggcat  | ggcgtgtcgt  | tttccgggcg  | gcgcgaagaa  | tccggacgcc   | 24840 |
| ttctggacgc  | tgttgaagaa  | cgggtgtcgac | gggtgtcacc  | aggtgccgcc  | agaccgctgg   | 24900 |
| aactcggacc  | agtactactc  | ctccgatccc  | gatgctccgg  | gcaaggcgta  | tgcgcgatat   | 24960 |
| gccgccttcc  | tcgaacgc    | tgacggtttc  | gatgcggaat  | tcttcggcat  | ctccccccgc   | 25020 |
| gaagctctga  | acatggatcc  | gcagcagcgg  | ctgctgctgg  | aagtgtgctg  | ggaagcggca   | 25080 |
| gaggacgccg  | gcctctctcc  | cggccctctg  | gcgggcagcg  | cgaccggcgt  | ctttgccggc   | 25140 |
| tcctgcgccc  | aggacttcgg  | actgtttcag  | tacgccgacc  | ctgcccgc    | cggagcttgg   | 25200 |
| tcgggttccg  | gcgtggcgca  | tagcatgttg  | gccaatcgca  | tctcctatct  | gctcgacctg   | 25260 |
| cgcggtccga  | gcctggcggt  | cgatacggcc  | tgtcctccg   | cgctcgtcgc  | cgctccatctg  | 25320 |
| gcttgccaaa  | gcctgcgccc  | gcgcgaatgc  | gatgcggcat  | tcgccggcgg  | agtgaacttg   | 25380 |
| atcctgactc  | ccgagggcat  | gatcgctttg  | tcgaaggctc  | gcctgttggc  | gcccgcagga   | 25440 |
| cgctgcaaga  | cgttcgacgc  | cgcagccgac  | ggttatgtgc  | gcggcgaggg  | ctgcggcatc   | 25500 |
| gtgctgctga  | agcggctctc  | cgatgcgctg  | gccgatggcg  | atgccatccg  | tgcagtcac    | 25560 |
| gcggctcgg   | caatcaatca  | ggacggacgg  | agcaatggca  | tcacggcgcc  | gaatctgcag   | 25620 |
| gcgcagaagg  | cggctcctgca | agaggcgggtg | gccaacgcgc  | acatcgatcc  | atcccacgta   | 25680 |
| tcgttgatcg  | aggcgc      | cacgggcacg  | tcgctgggcg  | atcctatoga  | gatcgaggcc   | 25740 |
| ctgcagtcgg  | tctacgacgc  | gccggactct  | gcgccttgct  | tgttgggttc  | cgtaaagacc   | 25800 |
| aacatcgggc  | atctggaggg  | cgcggcgggga | atcgcggggc  | tgatcaaagc  | cgtactcgcc   | 25860 |
| ctgcagcatc  | gcaccattcc  | tccgcacctg  | catttttcgcc | ggctgaatcc  | gaacatctca   | 25920 |
| ctggacggca  | gccgggtttcg | catcgccacg  | gaatcgctgc  | cgtggacgct  | ggaaggacgg   | 25980 |
| ccgcgtctgg  | ccggcgctcag | ctcgctcggt  | tttggagggga | gcaacgcgca  | cgctcatcctc  | 26040 |
| gaagaggcgc  | ctgcactccc  | tttgccgaag  | ccggctcacac | gcccgagct   | tctcactctg   | 26100 |
| tcggcgcgca  | ccgacgaagc  | gctcggcgaa  | ctggccggcc  | acttcgcgga  | gttccctgcag  | 26160 |
| tcgcaccgca  | atgcgttgct  | gtccgacgtt  | tgttccacca  | gtcaggttgg  | gcgcgacgca   | 26220 |
| tatagtcacc  | gcttggcgat  | caccgcccga  | gatgcggcag  | aggctgtagc  | ggcattggcc   | 26280 |
| gcggcgccgc  | ggcgcgaagt  | atcgttgcgc  | cggcgccggg  | caatcgcttt  | tctcttcacc   | 26340 |
| ggccaggggcg | cgcagtacgc  | cggcatgggc  | gcagagcttt  | ataaaacgca  | gcctgttttt   | 26400 |
| cgcgacgcgc  | tcgatcgctg  | cgcgatttgg  | ctcgtcccc   | agctcgatgt  | tccgctgacc   | 26460 |
| gttctcttgt  | tcgagtcgggt | ttcgccgttg  | cacgagacgg  | cgtataccca  | gccggcaatg   | 26520 |
| tttgccctgg  | aatgggctct  | ggctcagttc  | tggctgtcgc  | tcggcgctccg | gccggactac   | 26580 |
| gtgctggggc  | acagtctcgg  | cgagtatggt  | gcggcggtgtg | tggccggcgc  | cttttagcgtg  | 26640 |

|            |             |            |            |             |             |       |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------|
| gaggacggcc | tgcggctggt  | gaccgccagg | ggcgggctgg | tcaatgcgct  | tccccgcggc  | 26700 |
| aaagcggcca | tcgttcacgc  | caatccgagc | cgcacgcggg | cgctcgccgc  | caaggtggca  | 26760 |
| gtcgccgcat | cgaatgcgcc  | ggaccgcacc | gtgatctccg | gcacggctgc  | agaaatcgcg  | 26820 |
| gaagcgcaag | atgacctgca  | tcgcgcgggc | gtggaaacgc | gagagctgaa  | cgtatcgcat  | 26880 |
| gcgttccatt | cgccgctgat  | ggatccgatt | ttggacaagt | tcgaagcgct  | tgcaggtgcg  | 26940 |
| atcgcgatc  | agccgctggc  | gatcccgctg | gtgtcgaacg | tcagcggagc  | cgtattgccg  | 27000 |
| aaaggcacga | cactcgacgc  | ccgctactgg | cggcgacagt | tgcgcgaaac  | cgtgcagttt  | 27060 |
| gaaagcgcg  | tgcgaaccct  | ggcggaccgc | gagtgcgaag | tgtttctgga  | aatcggcccc  | 27120 |
| catcccacgc | tcaccacgct  | ggggcgatat | tgtctgcccc | atgacggcgc  | ggtctggctg  | 27180 |
| cactccctat | ctaaggggacg | atcggattgg | tcogtgcctg | tggaaagtct  | tggcggcctg  | 27240 |
| tttaccgcgg | gcgtgaatcc  | cgactggcgc | ggtctctatg | ccggggaatc  | acccagccgc  | 27300 |
| gtcgcgctgc | cgacgtatcc  | gtttcagcgt | gacaccttca | gcctgagacg  | cgtacccgcg  | 27360 |
| agagagccgg | cgcgcggcgg  | catggtggga | gcgcgcctca | acagcgcggt  | gggcgatgtc  | 27420 |
| atcttcgaaa | attcgctaac  | cacggagacg | cctctgctcc | atgagcacgt  | gatctacgac  | 27480 |
| gcggtcattg | tgcgcggcgc  | ctggcacgtg | tcggcatttc | tcgaagcggc  | acaggaagtc  | 27540 |
| ttcgggtccg | ttccctgcgc  | cgtctccgat | gtcatgatgc | ggcaggcaat  | ggccatcccg  | 27600 |
| ccggatacgc | cggtcacggg  | gcaagcgatt | gtcacacccg | gcgaggacgg  | cgaagcaaag  | 27660 |
| gtgcaggtct | tcagccagga  | tggcgattcg | tggaaagctc | acacggcagc  | cagtctgcgc  | 27720 |
| gcggcgactg | ccggcgccgt  | tcatttcgag | ctgcccggcg | agccttccga  | agtcatttcc  | 27780 |
| ggcgatgcgt | tctacggcgc  | gatgaacgca | cgcggcgtcg | atcttgcccc  | cgccttcagt  | 27840 |
| tgggtggaag | aagtctggcg  | tcgcgatggc | gaggcgctgg | ggcgaatgcg  | tctgccgggtg | 27900 |
| gctgaggatg | gcgcgaacgc  | ttaccggctg | caccccgggc | tgatcgattc  | ttgttttcaa  | 27960 |
| gtattcggag | cgacttgccc  | cgcggagcgt | tgccagcccc | gcgcatacgt  | gccgggtcggg | 28020 |
| atcgaagcgg | tgcgcttcta  | ccgtccgcgc | gcaggttctc | tgcgctgtca  | tgcgcgtctg  | 28080 |
| cgcgcgagct | cgagcggccc  | gttcgtcggt | gatctgacgc | tgggtgaaga  | gaccggcgcg  | 28140 |
| gtcatcgccg | agttttccgg  | actggctgta | atgcatgccg | gtacgctgca  | atccgcacag  | 28200 |
| tcgtggctgc | aggatgtgca  | gtggcaggag | tgcgagcgat | cgacaacggt  | gaagtccgac  | 28260 |
| ggccctggca | agccggagga  | ctggttgctg | tgtgccggcg | cagacgatgt  | cgccgggttg  | 28320 |
| atgccgcaag | agctgcgcgt  | cgtgtccggc | gtcactctcc | gccaggcgct  | ggaacagacc  | 28380 |
| cagactttgg | tcggccgccc  | ggcgcggtct | tggctgatca | cgcgcggcgt  | gcacgcacac  | 28440 |
| agtgatgacg | atgcgactcc  | cgtcgatcct | ttccaggctc | cactgtgggg  | actcgggcag  | 28500 |
| gcgatcgccg | gcgagcatcc  | cgagctgtgg | ggcggcctga | tcgacctcgg  | ttgcgacaa   | 28560 |
| gccgacatcg | ccgccgccat  | gctgctggat | gaaatccggt | atgcggcgca  | cgacaaagcg  | 28620 |
| atcgcatctg | gcaacggacg  | ccgctacgtt | cgccggctgg | tgcggcacia  | ggaaacgtcg  | 28680 |
| aagcggccgc | ctgccatttc  | agccgacggc | gtctatctga | tcaccggcgg  | tctcggcgca  | 28740 |
| ttaggacgaa | gggtggcacg  | ccgcttgatc | gagcaaggcg | cgcgcgcgtc  | ggtactggtc  | 28800 |
| ggccggcata | cggaggcagt  | tgccgatctc | gagcaactcg | gggctgcagt  | catggttgct  | 28860 |
| gcttgcgatg | tgagttccga  | gcaacagctg | gcggcgctgc | tggcggaccc  | gcgcacccag  | 28920 |
| ccgctgcgtg | gagtcgtgca  | tgcgcagggc | gtgctcgatg | acggggtagt  | tacagaacag  | 28980 |
| acgtgggctc | gtttcgagaa  | ggtgctggcg | ccgaagctgc | aggggtgcctg | gaatcttcac  | 29040 |
| cagctcactc | gccaccatgc  | gctcgacttt | ttcgtactct | tctcttccgc  | cgcttcgctg  | 29100 |
| ctcggttccg | ccggacagag  | caattactcg | gcggccaacg | catttctcga  | cagccttgcc  | 29160 |
| caatgcgcc  | gcgcgcaagg  | actaccggcg | ctgagcatca | attggggacc  | atgggcgggc  | 29220 |
| gaaggcatgg | ccgcgcgcac  | cgcgcggcaa | ggcctgccgg | gggtaccgct  | gctgccgcgc  | 29280 |
| gaagtgggtg | cgcgcatctt  | cggcgatctg | ctgggcgaga | ctgccgctca  | gacgcgggtg  | 29340 |
| ttccaagtct | ccgccgaaaa  | aaggcggagc | ccggcgagcg | atcccggtct  | catccagcaa  | 29400 |
| ctcaccgaag | ctgcgcggga  | gcggcggcag | gaactgctgc | agatgcgcac  | ccgcaagcag  | 29460 |
| gccggcgggc | tgctggcgct  | cgatgcgtcc | aagacgctcg | acccgcgcgc  | gccgctcaag  | 29520 |
| gaatacggac | tcgattcgct  | gatggcgctg | gatctggcgc | gcgccatcgg  | agagctgggtg | 29580 |
| cgcaagagcc | ttcccgcgac  | attgctatac | gaccatccga | ccgtcgagaa  | attggccggc  | 29640 |

|             |             |             |             |             |            |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| atatcgcgca  | gtggctccgt  | tactatccgt  | cgcccgcatc  | gatgtccctg  | ctggccggca | 17700 |
| tcgcacccgc  | ggccgcggac  | accaaaccgg  | cgcccgacat  | gcgcagcgag  | ctcctggcag | 17760 |
| ttccagccgg  | gcggcagcgc  | cgcgcgccgc  | tggaaacgct  | gctgatgcac  | gaagccggac | 17820 |
| acgtgctgcg  | cttcgatcca  | gcgaaactcg  | acggcagagc  | gacgctgggt  | gatctcgcat | 17880 |
| tcgattcggt  | gatggccctc  | gagtttcgca  | accgtctgga  | agccgggctg  | cgctcaagc  | 17940 |
| tttctgccac  | cctgatctgg  | cgttaccgca  | cattctccgc  | cctggcgag   | catctcgccg | 18000 |
| acaagctcgg  | cctgccgctg  | gaaagcatgg  | ccggcaatgc  | tgaaccttcg  | accgttgctg | 18060 |
| ccgttgctac  | ccttgctacc  | gttggcaccg  | ccgcgggcga  | ggaccggagt  | cccgcgctg  | 18120 |
| cagacgatct  | cgacgccgtc  | gcaaaccaga  | tcgccgggtt  | gggggacaaa  | gaaatcgaag | 18180 |
| ctttgttgaa  | acagaagttc  | gctcattttt  | caggagcctc  | cgagtgaagt  | cgatatccga | 18240 |
| gcgattcccc  | aaccttacgc  | cgttgcagca  | ggcgtacctg  | acgctggagc  | acatgcagcg | 18300 |
| acgtctcgat  | gcggccgaac  | gcgacgcgcg  | cgaacccatc  | gcgatcgtgg  | gtctgggctg | 18360 |
| ccggtttccg  | ggcggcgatg  | ggcccgatga  | gttctggcag  | atgttgcgca  | gtggagtcga | 18420 |
| tgctattcgt  | gaggtaccgc  | ctggacgatg  | ggacgaggag  | tcgggtccggc | gcatectgaa | 18480 |
| atcggtgaac  | cccgccacgc  | cggtgaagat  | tcaagccgga  | tttctcgatt  | ccatcgatgg | 18540 |
| tttcgacaac  | gatttttttcg | gcatttcgcc  | acgcgaggcc  | gtcagcattg  | atccgcagca | 18600 |
| gcggctgctg  | ttggaagtgg  | cgtgggaggc  | actggaggat  | gcggggcaga  | cgatggaagg | 18660 |
| gctctccggc  | agccgcacgg  | gcgtcttcgt  | cgggatccac  | agccaaagca  | gcgactatct | 18720 |
| ctggatgcag  | accgccgatg  | gcgcgcgcac  | cgatccgtat  | accgccaccg  | gcacggcgca | 18780 |
| tagcgtgatc  | gccggccgac  | tttcctatct  | gctgaacttg  | caaggaccca  | gcacgcgcgt | 18840 |
| cgacacggcc  | tgctcgtctt  | cgctggcggc  | ggttcacatc  | gcgtgccaga  | gcctgcgcag | 18900 |
| cggcgagtg   | acgctggccg  | tggccggcgg  | agtgaatctg  | cgcttctcgc  | cggagtttat | 18960 |
| gtacgccacc  | tcgaagatgg  | gaaccgcctc  | gcccgagcgt  | cgctgccgcg  | ccttcgacgc | 19020 |
| ggcggcggac  | ggcatcgtgt  | tcggagaagg  | ctgcggcgctg | gtggtgctga  | agcgccgtgc | 19080 |
| cgatgcactc  | gcggccggag  | accgggtgtg  | ggccgtgggtg | cgcggtcccg  | cggtcaatca | 19140 |
| ggatggccgc  | tcggccgggc  | tcaccgctcc  | caatgtcgtg  | tctcagcagg  | tcgtcatccg | 19200 |
| gtcggcattg  | gccaatgcgg  | gcgtcgcggc  | gcagcagatc  | ggttacatcg  | aagcccatgg | 19260 |
| cacggggact  | ccgctcggcg  | atcccacga   | gatcgaggcg  | ctggcgga    | ccgtcggcct | 19320 |
| cccgcgacct  | gtcggcgatg  | tgtgcgcggt  | cggttccctg  | aaatcgaaca  | tcggccacct | 19380 |
| ggagggagcg  | gcaggcatag  | cgggattgat  | taaagcgggtg | ctcgcatatga | gtcacgagac | 19440 |
| gataccgccg  | agcttacacg  | tgagacagct  | gaacccgaat  | atccgggttg  | agggaacgtc | 19500 |
| qctcgacatt  | gtgaagggaag | tcggcccggtg | gcccgcgggt  | tcgagacgaa  | ggtttgcggg | 19560 |
| gtcagcgcg   | tttgggttgg  | ccggcacgaa  | cgcgcatgtc  | gttcttgaag  | aagcggcgcc | 19620 |
| gactggtaga  | ggcgaagctg  | cgagcgggtt  | ccattcccga  | ccccccgccc  | ccgctgcgcg | 19680 |
| ggcggtgtc   | cccctcgcgg  | agggggacac  | tgggggcaact | cccgacattg  | caggcactcc | 19740 |
| cgacactgca  | gacactcccc  | acactgcaga  | cactcccagc  | attgcaggga  | ctgcaggcac | 19800 |
| tgccgcaact  | acgggcattg  | cagacgcgat  | gtatgtgctt  | ccgctgtccg  | cgcatggtgc | 19860 |
| ggacgaactg  | cgtcgggtgg  | cgcgggcata  | cggggaattg  | ctgacagcgt  | cgacgcacc  | 19920 |
| gagcctgcgt  | gatctttgct  | acacggccgc  | agtccgcgcg  | acgcatcacc  | gatgccggct | 19980 |
| cgctgtttcc  | ggcagaacgg  | ctgaagaact  | ggcggcgag   | ctccagggga  | tcacgatccc | 20040 |
| ttcccagcga  | cggaagacgg  | tattcgtctt  | ctcgggacag  | ggatcgcaat  | ggatcggaat | 20100 |
| ggggcgagc   | tggatggacc  | gcgaaccggt  | tattcgcgag  | gcgttggaac  | gctgcgaggc | 20160 |
| cgccatgcgg  | ccttatgtgg  | actggtcgct  | gaaagaagaa  | ctggcggaagc | tcgaccgcgt | 20220 |
| cgaggtcatt  | cagcctgcgc  | tcttcgcgct  | gcaggtcgcc  | atcgccgcac  | tgtggcgctt | 20280 |
| ctggggaatc  | gagccggatg  | ccgtcatcgg  | gcacagcatg  | ggagagggtc  | ccgccgctca | 20340 |
| tgtcgcgggt  | gcgtgacgc   | tgcaggatgc  | ggcgcgatc   | atctgcagcc  | gcagccggct | 20400 |
| gttgagccgg  | atcagcggcc  | tgggcgggat  | ggcgatgggtg | gagctgccgc  | tcgcggaatg | 20460 |
| tgaggccgtg  | ctgtcgactt  | acacggaacg  | actatcgccc  | gcgggtgtcga | acggacccaa | 20520 |
| ctccaccgtc  | atctccggtg  | aagtcgaagc  | cctggccgag  | gtcgctcgca  | cgctggagcg | 20580 |
| gcgaggcggtg | tcttgccggc  | cggtgaaagt  | ggacttcgcc  | gcgcatagcc  | cgcaagtgga | 20640 |

|             |             |             |             |             |            |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| ccattgtgc   | gacgaactcc  | tgcagtcgct  | cgacgggatt  | caaccgcggc  | ccgcgaccat | 20700 |
| acctttttac  | tccacgggtga | ccggcgcgac  | gctggagacc  | accagcctcg  | acagcacgta | 20760 |
| ctgggctcgc  | aatctgcgat  | cgcgggttct  | gttctggcag  | ggcatccgcc  | atcttgccga | 20820 |
| cagcggggcac | gatgtctttc  | tgcagatcag  | ccctcatccc  | atcctgctgc  | ccgccatcgg | 20880 |
| cggcaatgcg  | gcgctgggtc  | cgtctctgcg  | ccgcgaccag  | gacgaacgcg  | gttccatgct | 20940 |
| cacgtcgtcg  | ggcgccctct  | atgaggctgg  | gcacactgtc  | gcatggcgga  | ccgtgtaccc | 21000 |
| ttccgggcaat | tgcgtgcgcc  | tgccccggta  | tccttggcag  | cgtcgtcgtt  | tctggctcga | 21060 |
| cgttcccccc  | gcgcgacacg  | cgatcacggt  | gggcaatccg  | ctgttgggaa  | aacgcgtcga | 21120 |
| agcctcgacg  | caaccgggca  | ctttcttctg  | ggagacggaa  | ctcagtctcg  | cttccgtgcc | 21180 |
| ttggctggca  | gaccatcgcg  | tgcagggcga  | agtcgtcttg  | ccggctaactg | cgtatctcga | 21240 |
| tatggctctg  | gccggaactt  | ccgagacctt  | cggtgaaagt  | ccgtgcgtgc  | tggagcatgt | 21300 |
| gactttcaca  | cagatgctca  | ttgtgccgcg  | cgacggcagc  | atgacgttgc  | agctggccat | 21360 |
| cgcggtcgat  | agaccgggga  | tggcgtcgtt  | tcggatttcc  | agccggcagg  | catcgacatg | 21420 |
| ggtcctgcat  | gcttccgggg  | acattcgtca  | gacgcctgcg  | gatgcacgca  | ccgtcccgcc | 21480 |
| ggattctgcg  | gagacgggtg  | aggcccgcgtg | ccccacagtg  | gtgccggcgg  | cggagctgtg | 21540 |
| gcgtcagatg  | gcggagcacg  | gcgtcgagta  | tgggtccggct | ttccgcgcgc  | tcgagcagat | 21600 |
| ctggagttgt  | ccaggtgagg  | cgatcgggcg  | tctgcgtagc  | tcggaaacgc  | gttccactgc | 21660 |
| gccggcggtc  | ctcgatgcat  | gtctgcagat  | catcgccgcg  | gcgtttgggtc | ccgccgggtg | 21720 |
| aacctggctg  | cccgcgggca  | tcgaccggat  | gcgctggctg  | catcccgcac  | gttccgtggg | 21780 |
| gtggacgcat  | gcgcggctgg  | aaggacctat  | cgccgatctg  | tcgctgctgg  | acggagaggg | 21840 |
| acaactggtc  | gcccgcacgc  | agggctctgcg | gctgcagcgc  | ctggatgcgt  | cggagcgcac | 21900 |
| cgacatgcgc  | ggctgggttg  | acgaactgcg  | ctgggtcgtc  | cagccgcacg  | ccgctgcaga | 21960 |
| gccgcggcg   | gcgcgagcgg  | cgcggtcatg  | gctcattgtc  | ggcgtgtgg   | atagcgcgct | 22020 |
| caccgcacatg | ctgcgcgcta  | ccggcaaccg  | cgtgacgcag  | acctcgccgg  | aaaagctcga | 22080 |
| tgaactccag  | ccgccgctcg  | aggaaatcgt  | gtttttgtctc | gagcacgaac  | cctcatgcga | 22140 |
| ccgcattctg  | catctcctcc  | agaccctggg  | gcgcacgccc  | tggcgtcaag  | caccgcgcct | 22200 |
| atggctggtc  | acgcgcggcg  | cgcagccggg  | cgatggacag  | atcctgcaag  | ccggtatcgc | 22260 |
| tcaggcgcc   | ttctgggggt  | tgggcccggac | cgtgcattac  | gaacatccgg  | aactgaactg | 22320 |
| cacgctgatc  | gatctcgatc  | ccgccggcgg  | cgaagaggaa  | ctcctgcacg  | aactgctgac | 22380 |
| gaacaacggc  | gagaatcaaa  | tcgcctttcg  | cggcgccgcg  | cgttacgtcg  | cgcgctgggc | 22440 |
| tcggcacgaa  | gcggatatgc  | aaccgcgccat | gttcaaggcc  | ggcgatcggc  | cgttccgggt | 22500 |
| cgagatcgat  | gccccgggag  | tcctcgacgc  | gctgcgcttg  | cgggccacat  | cgcgccgccc | 22560 |
| cccgaagcc   | ggtgaagtgg  | agattgaagt  | ctgcgcgcg   | ggcctgaact  | tcctcgacgt | 22620 |
| tctgctcgcc  | ctcggcggtta | tgcgccgacga | tgcgcccggc  | gcgattgccg  | gcagcccgcg | 22680 |
| cctgggcggc  | gaatgctcgg  | gccgtatcgt  | ggccatgggg  | aaaggcgtca  | ccgactttcg | 22740 |
| catcgagatg  | gaagtgcgtg  | cccttgcgcc  | ttgcagtctt  | ggtcgcttcg  | tcaccacgcc | 22800 |
| cgccttcgcg  | gttgcccttga | agccggccaa  | cattcccgcg  | gaacaggccg  | ccgccctgcc | 22860 |
| tatcgcggtt  | ctcaccgcgc  | attacgcgct  | ctcgcgagcg  | gcgcggctgg  | cgcccgccga | 22920 |
| acgagtccctg | attcacgcgtg | ccaccggcgg  | tgtgggattg  | gcggcaatcc  | agatcgacac | 22980 |
| gcgtgcgggg  | gcggagatct  | tcgctactgc  | cgggagtcgg  | gaaaaacgag  | cgtatctgcg | 23040 |
| ctcgctgggg  | atcgcgcatg  | tttcggattc  | gcgtcgcgatg | gctttcgtgg  | acgacatccg | 23100 |
| caattggacg  | aatcaagaag  | gagtagacgt  | cgtcctgaat  | tcgctttccg  | gcgatctgct | 23160 |
| ggaggcgagc  | ttcgatctgc  | tgcgcgatca  | tggacgggtt  | atcgagatcg  | gcaagcgcca | 23220 |
| ttactatgcc  | ggccgcaagc  | tggggcttcg  | ccggttcctg  | aagaacctct  | cgtacacgct | 23280 |
| ggtcgatttg  | ctcggcatgt  | ccctgaagcg  | cccggcattg  | acccgggagc  | tgctgcagga | 23340 |
| gatggctcgca | aaattcgaa   | cggaaacctg  | gcggccctcg  | gaaacgcgag  | tgacgaccat | 23400 |
| caccgaatcg  | gtggaggcgt  | ttcgcaccat  | ggcgagggcg  | cggcacatcg  | gcaaaatcgt | 23460 |
| catggcgatg  | cgagattgcg  | ccaatgcgcc  | catcgacccc  | ctacgctcgg  | cgttcgatag | 23520 |
| cgagggaacc  | tacttgatta  | ccggcgggact | tggcggggtc  | ggtcttaccg  | tcgcacgctg | 23580 |
| gatgatcgga  | cgcgccgccc  | ggcggtctgg  | gctgctgagc  | cgccgcgcgc  | cttcacccga | 23640 |

|            |             |             |             |             |             |       |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| catgtcctcc | gcgaactcgg  | actcgacgtc  | cccagcgatt  | ccctcgtcga  | tgaagtgcgg  | 29700 |
| cagctgtccg | agcaggagat  | ggcggcggtc  | atcacggaaa  | ccttgacca   | tctgggagag  | 29760 |
| gaacgatgag | cgatctcact  | cctcttcaac  | aggcggctct  | ggcgtcaag   | cgcacgcgag  | 29820 |
| cgcgtctcga | cgaactggag  | agcgtccaca  | acgaaccat   | cgcgatcgtc  | ggcatggctt  | 29880 |
| gccgctttcc | cggcgcggaac | tcgcccgaag  | cattttggca  | gctcctgcac  | gatggcatcg  | 29940 |
| atgccatccg | cgaatctcct  | gcgggcccgtt | gggatgccga  | tgcgttttac  | gatcccgatc  | 30000 |
| ccaacgcgcc | gggaaagatg  | tacacgcgtc  | tgggcccgtt  | cctcgatggt  | gccgtcgacg  | 30060 |
| gcttcgacgc | cggcttcttc  | ggaatcacgc  | cgcgcgaggt  | cgcgggtctg  | gatccgcagc  | 30120 |
| agcgctgct  | gctcgaggtg  | gcatgggaag  | ctttggagcg  | tgcgggtcgg  | ccgcccgaca  | 30180 |
| gtctcgcggg | cagcgacacc  | ggagtgttca  | tcgggatcag  | caccgacgac  | tacagccggc  | 30240 |
| tgaaacctac | cgatccggcg  | ctcattgacg  | cctataccgg  | taccggaacc  | gcgttcagca  | 30300 |
| ctgccgcggg | acggatctcc  | tatctgctgg  | ggttgcaagg  | accgaacttc  | cccgtcgaca  | 30360 |
| cggcgtgctc | ttcctcactc  | gtggcggttc  | atctggcggt  | ccgcagcttg  | cagtcgcgag  | 30420 |
| agtgcagcat | ggcgtggcc   | ggcggcggtga | acctgattct  | ggcgcgggaa  | agcacgatct  | 30480 |
| acttctgcgg | cctgcggggc  | atggcgggcg  | atggccgttg  | caaaagtttc  | gctgcctccg  | 30540 |
| cgacgggtta | cggccgcggc  | gagggatgcg  | gaatgctggt  | gctgaagcgg  | ctgtccgatg  | 30600 |
| cgacgcgtga | cggcgatcgt  | attctggcgc  | tgattcgcgg  | atcggccgtc  | aaccacggcg  | 30660 |
| gccgcagcaa | cggcctcacg  | gcgcggaacg  | gtccggcgca  | ggaagccgtg  | attcggggcg  | 30720 |
| cgctcaagaa | cgcgggcatg  | gccccgcgg   | atgtcgatta  | cgtggaagcc  | cacggaaccg  | 30780 |
| ggacgccgct | gggagatccc  | atcgaactgc  | gggcgatggc  | agcgggtgctg | ggcgagggggc | 30840 |
| gtgccgtcga | ttctccgttg  | atcgtcgggt  | cggtgaaaac  | caacttcggc  | cacctggagg  | 30900 |
| cggcggcagg | tatcgccggc  | ctgatcaaga  | ccattctcgc  | cctgcagcac  | cgagagattc  | 30960 |
| cgccccatct | gcatttcaac  | gcgcccgaac  | cgcacgtact  | ctggaatgag  | ctgccgctaa  | 31020 |
| agatagccac | cgcattgttcg | ccatggccct  | ccaacggccg  | cccccgagtt  | gccgggggtga | 31080 |
| gctcgttcgg | aatcagtggt  | accaattcgc  | acgtcgtcct  | cgcagaagcg  | aagacgaatg  | 31140 |
| tagaagcgaa | gacgaatgta  | gaggcgaaga  | cgaatgtaga  | ggcgaagacg  | agtgaagagg  | 31200 |
| tcaaggcgag | tgtagaggcc  | aaagggaaatg | tggaggctaa  | ggctagtgt   | agtgtcccc   | 31260 |
| tcctcgaggg | ggacagccgc  | ccgcgaagcg  | gcggcggggg  | gtcgggcccgg | ccgcccagcc  | 31320 |
| gcgaggaagt | gccgggtccc  | gatcaactcc  | atgccgaaga  | cggccgcgaa  | tacctcctac  | 31380 |
| cgttttcggc | gcgccatccg  | caggctctgc  | gcgatctcgc  | cggcgccctat | cgcgatgggc  | 31440 |
| gctttcacgc | tcgctctccc  | gcgctgtgtt  | ccgcgcggcag | cctgacgcgc  | agtcactacg  | 31500 |
| aacatcgcgc | agcgtttgtg  | gcctcatccc  | tgcccagagtt | caatcaattg  | ctcgaggcct  | 31560 |
| ccggcgcaa  | tgaaaccaat  | cgcggcgctc  | ccaccggttt  | cgcgatccc   | ggagttcgtc  | 31620 |
| cgaaactcgc | cttcatcttt  | tcgggccagg  | gcggacagta  | cccgcgcgatg | gcgtatcgcc  | 31680 |
| tgtattccga | cgagcctgtc  | ttccgatcgg  | cgatcgaacg  | ttgcgacgcc  | gccttcgcga  | 31740 |
| gcttcgtgga | atggcggtt   | gcggacctgc  | tcgcccagca  | gtcgggagca  | tggctgagcc  | 31800 |
| agatcgatcg | cgtgcagcct  | gcgctgttcg  | ccgttcaaat  | cgcgctggtc  | gaactgctgc  | 31860 |
| aatcctgggg | aattcgcccc  | gacggcggtg  | ccggacacag  | catgggagaa  | gtggcgggcg  | 31920 |
| cccatgtcgc | aggcattctc  | accctggagg  | acgcggcccc  | catcatctgt  | cgccgcagcc  | 31980 |
| ggctgttgct | cggacttcgc  | ggccggggag  | cgatggctct  | ggtcgaactg  | ccgctcgatc  | 32040 |
| gggcaaggc  | cgtgctcgct  | gaacgcgggtc | tcactactgt  | ttctgtcgcg  | gccagcaacg  | 32100 |
| gaccacgcag | cacgggtgttc | tcgggagacc  | gtgtggctct  | cgagcatttg  | aaggacgact  | 32160 |
| tcgagaggcg | cggcgtcttc  | tgccggctga  | ttcagggtga  | tgtcgcttca  | cacagctcgc  | 32220 |
| aggtggacc  | gctcgagaac  | gaattgcgcc  | aggaactcgg  | ccgcgttatt  | gcaaaacgtt  | 32280 |
| ccgccgtgcc | gttcttctcc  | acggttgaag  | gacagttgag  | cacgggagag  | gcgtgcgacg  | 32340 |
| cgtcgactg  | ggtagccaat  | ctgcgacagc  | cagtccgttt  | ctgggagtcg  | ttgcaggcga  | 32400 |
| tggctggtga | tgagttcacg  | cagttcctgg  | agatcagtc   | gcattcctgtg | ctgacgccgt  | 32460 |
| cgatcgagga | tagtctgcgg  | acgtcggca   | taaacggact  | ggttcgcccc  | gtactgcgcc  | 32520 |
| gcgacgaacc | ggagcggcgt  | gagctgctcg  | agttgctcgc  | cgcgctctac  | gtgaatgggc  | 32580 |
| agcgtccgga | ctggcgcgcg  | ctcgcttcgt  | ctcccgcac   | gcgcctggat  | ctgccgacgt  | 32640 |

|             |             |             |            |             |            |       |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------|
| atccctggca  | gcgcgagcgc  | ttctggttcg  | cgacctcgac | gcggcgaaagt | ttgccggcag | 32700 |
| ttggcgggtca | tccgctgctc  | ggtcgcaagg  | tcgagattgc | gctggcgccg  | gacacacacg | 32760 |
| tctgggagtc  | cgtgctctct  | ctggatgcgc  | tgccgtttct | cgccgatcac  | cggctcaacg | 32820 |
| agcttgtggt  | gcttcccggg  | gccgcttatg  | tggagatggc | gctggccgca  | gccaaggaag | 32880 |
| tgttcgcggg  | tggctgcagc  | ctggaagaga  | tccggtttga | acaaatgctg  | gttgttcctt | 32940 |
| ccgcggggcg  | ctcgcgagtg  | caggtcatat  | tcgagggaca | cgcattccgc  | atctccagtc | 33000 |
| tggccgaagg  | cggttccgat  | tggaccgagc  | acgcgcgcgg | caccatggct  | gcggcgcccg | 33060 |
| acaaggtcgc  | gcccacgggtg | agcctgccc   | cacttgggga | tcgcatcgag  | ggcgatgact | 33120 |
| tctatgcggc  | cttcgcatcg  | caggggatgc  | attacggcga | caccttccgc  | ggcatcgccg | 33180 |
| aagtgtggcg  | gcgcgacggc  | gaggcagtg   | cgcgactgag | cgtgccggat  | gccgttcgcg | 33240 |
| aagcagagtc  | cggttacacg  | cttcattcctg | ccttgctcga | tgccgttttg  | caggtgctgg | 33300 |
| gcgcgacgct  | tggcggcgaa  | ggcagcgccg  | gtccttgctg | gcctgtcgcc  | atcgaaacgg | 33360 |
| tgcactgttt  | cggcagaccc  | gccggcgatc  | ttagggtgca | tgccgggctg  | acggggcgcc | 33420 |
| tcgagggcgga | tgtcaccttg  | tgtgatgcgg  | aaggccacgt | catcctcgag  | gtccaaggcc | 33480 |
| tgcgtgccc   | ggaactggag  | cgccaatccg  | aatggttcca | cgctatggaa  | tgggagccgc | 33540 |
| agctgctggc  | cgagagtcca  | acggcaacgg  | tgtcgggtgc | atggctggtc  | attgccgatg | 33600 |
| ccggcgccat  | cgcagcccg   | gtggcgcgag  | ggctgggcac | aaacacgggt  | gtgatttcgg | 33660 |
| gtcgcgatgc  | cgagataccg  | gatcagcctt  | accggggcgt | cattcactgc  | gggagcctgg | 33720 |
| atgagaccga  | ggatgagacc  | gatccgctcg  | ctgcgggggg | aaccgcctgc  | gaagacattt | 33780 |
| tgcgcacgt   | tcaagaattc  | ggagtgggac  | gcatacagct | gacgaaacaa  | gcgtccgacg | 33840 |
| ccgaatcgca  | gcatccgcga  | atctggctga  | ttacggcggg | cgttcattgcg | gagcatctgc | 33900 |
| agatgccggg  | ggtgcccgcg  | cgggcaccgg  | tgtggggctc | gggacgtacc  | atcgcgcccg | 33960 |
| agcatcccga  | gttcgcttgc  | acctgcacg   | atctcgacac | tgccggtgaa  | gtcgaggtgc | 34020 |
| aggcgctctg  | ccgagagatt  | ctcgcgggga  | gttctgaacg | tcaggggcccg | g          | 34071 |

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 4615

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 115

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| actgcagtgc  | ccggaatcgg  | cgggtggactt | acagcagccg  | ctgggtgcgta | tgggattgga  | 60   |
| ctcgtctcatg | gcgggtgcaat | tacgcaaccg  | gatcgatacg  | gatctgcgcg  | tcttgctgcc  | 120  |
| catggtccga  | tttctagacg  | gccccagcgt  | tgccggaactg | gccagggatc  | taagcgatct  | 180  |
| aagcggcctc  | agcgaacgca  | cgacgggtggc | gccggaacct  | gcggcgccagg | cctcggttcc  | 240  |
| tgcctctctc  | tacctctca   | gcgcgggcca  | gcaggcgctt  | tggtttattt  | accgaagcgc  | 300  |
| gccggaaagt  | ccgcataca   | acatcgcgctg | gatcgcgcgc  | gcgagaggcg  | ctttcgatcc  | 360  |
| gcaggcggtg  | cgcggttcgc  | tgcaggacct  | ggtggatcgt  | catccggcgc  | tgcgaacgac  | 420  |
| gattgcggag  | agtggcgggc  | caccggttca  | aacgggtccac | agcagcgctc  | cgggtggattt | 480  |
| cgaagtgatc  | ccgtgttcgc  | cggacgatga  | ggcgggtgctg | atcgacggcg  | tcttccacgc  | 540  |
| gcccttcaat  | ctcggcgaaa  | actgtttccg  | ctcgcgtctc  | ctgggtgcagt | cggggaagga  | 600  |
| tcaggttctg  | gccatcggtg  | tgcatacat   | cctcgccgac  | ttctggtcac  | tgctgggtgat | 660  |
| ggtggatgaa  | ctccgcagta  | tctacctcgc  | gaggacagct  | ggcggtccgc  | ctgtcgcgcc  | 720  |
| gccggtcgcg  | agcttcgccc  | ctttcgctccg | ctggcagaac  | gaactgttgg  | ccggaaccga  | 780  |
| gggcgagcgg  | ctttggaact  | actggctcctc | gcagctttcc  | ggccagcttc  | cggttctgaa  | 840  |
| tctcccgtcg  | gacgttccca  | gtccgcgggt  | gcagagtttc  | cggggaaact  | ctcactcggt  | 900  |
| ccgaatcgaa  | cccgcgctga  | ctgcgaaact  | gaaggcgctc  | gcgcggcgcc  | agaacgcgac  | 960  |
| gctgcagtgc  | acgctgatgg  | cggcggttca  | agtgttctc   | tcccgttgga  | cctcacaaga  | 1020 |
| agagatcctg  | accggcaccc  | tcaccaacgg  | tcggacgcaa  | ccggaattcg  | ccgatctcgt  | 1080 |



cggatacttc gtgaatcccg taatcctgcg aggagaactt tcaggcgatc cggatttcaa 1140  
tacgggtgctc gcccggatc ggcaaacgct tctcggcgcg atcgagcacc aggagtaccc 1200  
gtatgcccg atcgtggagc ggttgggtcc cggactcgcg gttctattcg tgctccagca 1260  
gcctcatcgc attcccgaa cctgcccgtt catggtgggt cagtccggcg gtcgcatggc 1320  
ctggggcagc ctcacactgg agtccctggc gatgccgctg cgacagagcc ggtttgacct 1380  
ggatctgatg atggtcgaaa ccgatggagg cctctccgcc tttctgcaat acaacacgga 1440  
catttttgat gctgccacga ttgaacgtct ctccttgac ttcgccgtgc tgctggaagg 1500  
aatcgcgag aatcccgcc gtccagtgtg cgatctaccg ctgctgacaa cccgggaacg 1560  
catccagctg ctcgaagagt ggaatgcgac cgcccgaggaa tcccggtccc aatgcgtgca 1620  
cgagctgttc gaagctcagg tggagtggac gcccgacgcc atcgcggtga gcttcgggtga 1680  
gcagaatctg acatatacgc aactcaacgg gagcgccaac cggatcgcg actatctccg 1740  
ctcgcgcgcc gctggaccgg gcgaaatggt tggcatccat gtcacgcggt cgctcgaaac 1800  
cgtcgcaggg ctggtggcg tccctgaaggc cggcgcgcc tacgttccgc tggaaaccgga 1860  
atatccggcg caacgtcttc ggctgatgct ggaagagacc aggcgggtcg ttgtgctgaa 1920  
tgctacggaa tcggaagtat ggacgcagcc cgacaccaat ccgaaccgc tcgcgactcc 1980  
ggcgatctc gctatgtcc tgtacacctc cggttcgacc ggccggccga aaggcgtgca 2040  
aatcacacac caggccgtcg tcaattttct ttcgtcgatg cggcatgagc cgggcatcag 2100  
cgaccgcgat acgctgctcg cctcaccgac gttcatgttc gacatttccg cgctcgagat 2160  
ctttttgccc ttgagcgccg gcgcgcgct cgtgggtggcg aaccaggaga cggccgtcga 2220  
tggtgagagg ctggcgaggg aactcgcgcg cagcaaagcg acaatgatgc aggcaactcc 2280  
cgccacctgg cgtctgctgc tcgcatccgg ctggcccgcc gaccgccgcc tgacggcgct 2340  
ctcgggcggt gaagcccttc ctcgcgatct tgccgaccgg ctcttgcaac gaaccgcggc 2400  
gctatggaat ctttacggac ctaccgaaac gacaaatttg tccgccatcc aacgggtgac 2460  
gacaggtgac ggaccggttt cgattggcgg ccccatcgca aacactcagc tctatgtgct 2520  
tgacgatcgg atgcagcccg caccatccgg tgttgcgggc gaactgtaca tcggcgggcg 2580  
cgggctcgcc cgtggatacc tgaatcgtec ggaactcagc gcggacaagt tcgtcgccaa 2640  
ttcgttcgac cctcatggca ctcggtgta tcgcacggga gatctcgccc gccgccaacg 2700  
cgacggcgcg ctcgagatc tcggccggat cgaccaccag gtgaagatac gcgggttccg 2760  
catcgaaacc ggcgagatcg aggcgcggt ccgcagtcac ccggcggtcc gacatgctgt 2820  
ggtcaccgcc agagaaaatg acgcggccgg taagtatctg gcggcctaca ttgtcccccct 2880  
tgctgacggg catcgcgca cggcagccgc cgacacattc cagcaccgag tcgagtccga 2940  
qcacgtgacg cagtggcaat ccgtctggga caccacatat gaacagaatg cgccgaacgc 3000  
gatccggag ttcaacatcg tcggctggag aagcagtggt accggagagc cgattccagc 3060  
tgccgagatg cgggagtggg tgcaggattc cgtcgatcgc atcctggcct cgcggcccg 3120  
tcgctgctc gagattggct gtggtacggg actgctgctc ttccgcgtcg ctccccactg 3180  
ttcggagtac tgggccacgg acttttcgca gaaggcgctg gactacatcg ccgctcacgc 3240  
ggaccgcacc ggctggcaa atgtccgcac gttccggcag gcggccgacg acgctgcca 3300  
gatcgacagt cgctcgctgc atgcggttgt tctgaactcc gttatccagt acttccccgg 3360  
cgaagcgtat ctggcgcg tgctggccga ggcggtgctg gtggtcaaac cggcgggcat 3420  
cgtatttgct ggcgatgtcc gcagtctccc gctgctggag acgttttacg cttctttaga 3480  
agttcagcgc gcaccgcgt cgttgaccgg gaatgagttt cggcaacgcg tgcgttcgct 3540  
cgctcgagc gaagaggaac tcgtggtcga tcccgcttc ggccggctgc ataacgagct 3600  
gattccggag atcgccgga ttgaaatcct gccgcgtcgc ggcgggtgc ataacgagct 3660  
gaccgcctc cgctaccagg cgatcctgca tatcggatcg cgggaagcgg aggagccgga 3720  
atcggatcgc aggcgttgcc agaccgcggc cgaaatacgc agagtactga cggacgctca 3780  
gccggagtgt gccgcattta ccgagattcc gaacgcacgg ttgaccgccg aaagcggcat 3840  
tgtgacctgg atgaacggtg acgaagctcc agagacactc ggggagtgtg gggaccggct 3900  
gcgccagacg tcgcttccg gcgtcgatcc cgccgatcta tggcgatgg acgaagacct 3960  
gccgtaccgc gtggcaatcg actggagcag tcatgggcca cagcgacgct tcgacgcgac 4020  
cttctgcgct gcggcgccg gtccgcggc ttcccgctcg cgacgccgcc tggccggccc 4080

```

gtatacgaac gatccgctgc gagccgtcta tacgcgcacg gttgtgccgc agttgcgtac 4140
tcatctgaag gagaagctgc ccgactacat gatcccgacc gcgtgggtcg tgctccacga 4200
aatgccgctg acgcccacg gaaaaatcga ccgtaacgcc ctgcccgatc ccgagcccag 4260
ccggcgagcc cacgccgaag cattcacgcc tccggaaact ccggtggaac aggtactcgc 4320
ccacatttgg ggcgaggtgc tcggcatgga tggcatcggc gtccatgata acttcttcga 4380
ctctggagga cattcgctgc tggtcacgca gatgatcgcc cgcgtagcgc acatgctcca 4440
cgtggaagtg ccttttcgaa ccgtgtttaa cgcacctacg gttcgaggct tcgcccgcgc 4500
tattcaggac ggcgtagacc caggatgggc aaggcgagcc gccgatttgc tgatcgctgt 4560
ttcccaaatg tcagatgttc aaatcgagcg tatgatgagc gccgccaag actag 4615

```

&lt;210&gt; 116

&lt;211&gt; 8301

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 116

```

atgcagaatt cgtcgccaaa taccatagac ctctcgctcg cccgcccga attgctcgac 60
cgtctgctgc aggaaaacag ccccgaaacat cgcacccgc ggcgtgaaaa ccgggatgcc 120
gcacccttgt cgctggccca gcagcggctt tggtttctcc atcagctcga cccggattct 180
ccgcctaca acattcccat agcgtgcat atccgaggtc cgctggatat tcgctcctc 240
ctgcccagtc tggaggccgt ggtgcagcgg cacgagagcc tgcgcagctg cattggcggt 300
gtggatggag aggcgcgcca gagcctcctg gcgcgagtga cactggaact tccggttgtt 360
caggctgacg gaatcgcaga agcgcggcaa atggccttgc gtgatgcca gatcccgctc 420
gacctgcgaa aacccccgct tctgcggacc aagctgatct gcctcgatga caagcagcag 480
attctcctgc tgacgttgag ccacatcatc gcggatgcgt ggtcggtcga gacgttcgtc 540
cgcgacctga cgcgatcgta cgaagcgttc gtgcaggggc ggccatcgcc gctcatggaa 600
ctgcccgatc agtatggcga ctggggccgtc catcagcaga cgtcgctgaa ccaaaccgcg 660
cagcagtact ggaagaaaca gctgtcgggc acctgcctt tcctcgacct tcctaccgat 720
cgcccccggc ccgcgcagca gacctggcgg ggcgcgctgg agaccacagc cctcggccgt 780
gatttgaccg atggactcca cgcgtttgcc ttgcgtgaag gagcgacggg gttcatgacg 840
gcaatcgcg cgtttcaggt gctgctgcat cgctataccg cgcaggaaga catccttacc 900
ggggttccag tcgcggggccg tacacaacga gaaacggaag gtctcgtcgg ttgtttcgcc 960
aacatgatcg tcctgcgcgg cgatctgcgc gacgatccgt cgtttcgcag tcttctcgcc 1020
cgcaccgcgc acaccgcttt gagcgcacct tctcatcagg actttccttt cgaacgcctg 1080
gttgaggaa tgcacacctc gcgggacctg agccggctgc ctgtatttca ggtctccttc 1140
gcgctgctgc ccgatgcgcc ggccatcacc gtcatgcctg ggctcaccat ctgcgcgag 1200
tacatgcaca acggcggtac caaactcgac ctcggcgtga ccctcgagcc atccggcgat 1260
ggactgatgg cgtccgcca atacaacacc gatttggtcg atgcggcaac catcgccctc 1320
ctgctcgatg cgtaccgaac cctgctggcg agcgtggtga cggatcccga cgtccgcatt 1380
tcaaccgctg cgctgttgtc cccgcgggtc cgaagccgga tgctcgagca gcacaatgcg 1440
acacggcgcg atgcgggtcc gaacgggtgt gcgcatgaac tggtcgaagc tcaggcgga 1500
cgcaactcgc acgcgctgc cgctgtcttc gaagaccatc agttgacctc cgccgagctg 1560
aatgcgcggg ccaaccgcct ggctcatcgt ctgagcgcac ccggcgcggg cccgggaaag 1620
atcatcgctc tggcgatgga gcgctcgctg gagatggtga ttgcgctgct tgccattctg 1680
aagtccggca gcgcgtacct gcctctcgat cccgcgcacc ccaaggatcg tctcgcccgg 1740
attctcgatg aagtgaacc gcacgcgggtc ctacgcagc aggcgggtggc tgagatgatg 1800
gcgatgatgg cgatgatggc ggtcgccgtc gaaccagaag ctgcgaatct cgtcagcggc 1860
agcaagccc acgatctcgc ctacatcata tatacctccg gatcgacggg gcgaccgaag 1920
ggcgtggaga tccgccactc gtcgctagtc aatctgctgc gctccatgca gcgcgagccg 1980

```

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggtctgacag  | ccgccgatgg  | gctgggtcgcc | gtcaccaccg  | tgtcattcga  | tattgccgga  | 2040 |
| ctggagatct  | ggctgccgtt  | gatcacccgg  | gcccgcgtca  | tcgtcgccac  | ccgcgagatc  | 2100 |
| gtgggttgacg | gcgagcggct  | caccaccctg  | ctggataagt  | cgggcgctac  | ggtcacgacg  | 2160 |
| gcgacccccga | gcggttgggc  | gcaattgctg  | gattcgggct  | ggaagccggg  | taaaggcttc  | 2220 |
| cgtgttttct  | gcggcggtga  | agctctgccg  | ccggaactgg  | cgcgccgcac  | tctcgatagt  | 2280 |
| ggcgtagagc  | tgtggaatct  | ttacggaccg  | acggagacca  | ccatatggtc  | ggccgtgcac  | 2340 |
| aagacacaaa  | gactgggtgc  | ctccgatagc  | atcgtgccga  | tcggccatcc  | catcgacaac  | 2400 |
| acgcagttat  | acatcctgga  | ttcgcgcacg  | gagccggttc  | cccccgaggt  | tccgggagag  | 2460 |
| ctgtacatcg  | gaggagcggg  | actggcgcg   | ggctatcatc  | gcaacccccga | gctcacgcgt  | 2520 |
| gagaaattcc  | gcgagtggcg  | tgatcgagga  | cgcatttact  | ctaccggcga  | tctggctcgc  | 2580 |
| taccgttccg  | acggcgacgt  | cgagtgcctg  | ggacgagtcg  | atcgccagat  | caagctgcgc  | 2640 |
| gggttttcga  | tcgaaccggc  | cgagattgag  | gccgcgatcg  | agacgcacat  | tgccgtgaag  | 2700 |
| caggcgatta  | cggctcgtgaa | ggacgatcgg  | ctgatcgcc   | atctcgttcc  | ggcaacgggc  | 2760 |
| gacgtgcgcg  | atctgcagag  | cgatttgccg  | tcgtggctgg  | caacgcgcct  | tcccgatcac  | 2820 |
| atgatccctc  | cggcggttgt  | cagcctgtcc  | tcccttcgcg  | tgacgccccaa | cggcaaaatc  | 2880 |
| acgcgaacg   | cgttcccggg  | tttgcccaca  | acgcgggttg  | ctgctcgcca  | gccgatgcgc  | 2940 |
| ggcgatgtgg  | tggagacgat  | tgctgccatc  | tggcgtagag  | ttctgcgcgt  | ggagcacgtc  | 3000 |
| gactatcggc  | agaacttctt  | tgatgtcggc  | gggcactcgc  | taatgctcac  | acgggtgcgc  | 3060 |
| ggactgctcg  | aggagcgcc   | gggttgacg   | ctctccgtcg  | tcgatctgtt  | ccggcatacg  | 3120 |
| acgatcgagt  | cgttgccggg  | cctggcagaa  | aaatccgaac  | ccgccgctgc  | ggaacctgcg  | 3180 |
| gctgcggctg  | cagaagatcg  | gatcgcagtt  | atcgggatgg  | ccggccggtt  | cccggggggc  | 3240 |
| cgcaatgtgg  | aggagtcttg  | gcgcaatctg  | cgcgacgggtg | tggattccat  | cgccaggctt  | 3300 |
| tcgccggaag  | atctgctggc  | gggcggcatc  | agccccggagg | tcttccagga  | cccagagctac | 3360 |
| gtgccggcca  | agggtctgct  | ggacggcatc  | gagtttttcg  | atgccgcgtt  | cttcggctac  | 3420 |
| agtccgcgcg  | aagcggagat  | catggacccg  | cagcatcgcg  | tgtttctcga  | gtgcgcgtgg  | 3480 |
| gaagcgatgg  | agaacgcggg  | atatgcggcg  | cgaagctata  | agggttcgat  | cggcggtttc  | 3540 |
| gcgggatgcg  | gcgtcaatac  | ctacctgctg  | aacaacctcg  | ccaccgcgga  | gccgttcgat  | 3600 |
| ttctcacgcc  | cctccgcgta  | ccagctgctg  | acggccaacg  | acaaggattt  | cctggccacg  | 3660 |
| cgtgtctctt  | acaagctgaa  | cctccgcggg  | cccagcctga  | cggttcagac  | ggcgtgctcc  | 3720 |
| acctcgctgg  | tgtcggtggt  | gatggcatgc  | gagagcttgc  | agcgcggcgc  | ctcggacatt  | 3780 |
| gccttgggcg  | ggggagtggc  | catcaatgtt  | ccgcagtcgc  | tggggtacct  | gcaccagccg  | 3840 |
| ggcatgatcc  | tgtcgcccga  | cgggcgctgc  | cgcgccttcg  | atgagtcgcg  | tcaaggcacg  | 3900 |
| tgccggggca  | acggcgcggg  | tgtggtcgtc  | ctcaagcgct  | tgagccgcgc  | tctggccgat  | 3960 |
| ggcgacacga  | tctacgccgt  | cattcgcgga  | gcggctatta  | ataatgatgg  | cgccgagcgc  | 4020 |
| atgggggtta  | ccgtccagg   | tgtggacggt  | cagacgcgat  | tgattcggcg  | cactcaagag  | 4080 |
| atggcgggcg  | tgaagccgga  | gtccatcggc  | tacatcgagg  | cccacggaac  | agccacgccg  | 4140 |
| ctcggcgatc  | cgggtggagat | cgccgccatc  | gctgccaaact | ttccgaaaaa  | cgggaagcggc | 4200 |
| gatgtgtata  | tcggatccgt  | caagaccaac  | atcggtcac   | tagacgtcgc  | ggccggtgtg  | 4260 |
| gccgggctga  | tcaagacggt  | gcttgccgtc  | catcgcgggc  | agattcctcc  | cagcctgaat  | 4320 |
| ttccagcgtc  | cgaatccgcg  | aattgatttc  | gcaaacactc  | cgtttcgtgt  | gagtacgcgg  | 4380 |
| ctgctcgact  | ggcccgccgg  | aaagaccccc  | agacgagcgg  | cagtcagttc  | gttcgggac   | 4440 |
| ggcggcacca  | acgtcacgt   | gattctggag  | caagcgccgc  | cggtgacgcc  | ggccgcagct  | 4500 |
| gcgcccgaac  | gatccgcaca  | tgtgctttgc  | ctgtccgcca  | atacagacgc  | ggccctcgaa  | 4560 |
| gaactgggtg  | gctcgatatc  | cggccatatg  | gacaaccagc  | ccggtttgtc  | gttcggcgat  | 4620 |
| gtcgcatcca  | cggccaatgc  | agggcgcgtg  | cacttcccgc  | accgtatctg  | cattgtggcc  | 4680 |
| cggctcgagcg | acgaggctcg  | ccaacgactg  | acggaggcac  | gacgggttcg  | catcgcccag  | 4740 |
| acgcgcccc   | agattgcgtt  | tcttttcacc  | gggcaagggtg | cgcaatacgc  | gggcatgggc  | 4800 |
| cgccagttct  | acgagtcgca  | gccgggtgtt  | cgcgcgcga   | tggatgaatg  | cgcagctctg  | 4860 |
| ctgaatggac  | ggctcgatct  | gccggcgctg  | ttggccgatg  | acgcgttgct  | cgacgcgacc  | 4920 |
| gccggcgcg   | agcccgcgct  | gtttgctttg  | cagtgggcct  | tggcgagtt   | gtggaagtcc  | 4980 |

|             |             |            |            |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| tgggggtgtga | cgcccgacct  | ggtgatggga | cacagcgtcg | gcgaatacgc  | ggcggcgtgt  | 5040 |
| attgccggcg  | ccgtcagcct  | gccggatgcg | ctcggcttag | ttgccgaacg  | cgcccggttc  | 5100 |
| atgcagaacc  | tgccggaagg  | tgcgatggct | gcggtcagcg | ccggcgagca  | gcgctgtgcc  | 5160 |
| gcagcgatca  | cctcgcgcgt  | ctccattgcg | gccatcaacg | gacccgctga  | ggtcgtgatt  | 5220 |
| tcgggtgcmc  | cgcaggatat  | tgagagcgcg | ctggcaactc | tacgtgcgga  | gggcatcaaa  | 5280 |
| acgcagatgc  | tggccgttgc  | gcgcgccttt | cacagctcga | gcatggatcc  | gattctggcg  | 5340 |
| gacctgcaac  | gccggggcgg  | ggcgatcgcg | tggcgcaatc | cttcgatcgg  | cttgggtttcg | 5400 |
| aacctcacgg  | gcaaactggc  | cggcgaggga | cagctggcga | atccgctgta  | ctggcgagat  | 5460 |
| cacgctcgaa  | accctgtccg  | tttcgcgcac | ggtatccaaa | cgctcaagga  | cgaaggctgc  | 5520 |
| gacgtgtttc  | tcgagatcgg  | tcctaagccg | gttctactcg | gcatggggcca | aaagtgcctg  | 5580 |
| cccgcgcgcg  | ccaagcagtg  | gctgccgtcg | ctgcgtaaag | gccgcgatga  | gtgggagacg  | 5640 |
| attctcagca  | gtgtggcgac  | gctatatcag | ggtgggttcg | acatcgattg  | gcaggagttc  | 5700 |
| gaccgtccgt  | attcgcgaag  | gcgtgtcgcc | ctgccggcct | atcctttcga  | gagacgccgc  | 5760 |
| cattggatcg  | agcggagttc  | cagaccggaa | cctgtagcgg | ttgcgagtg   | tctcgtcggg  | 5820 |
| tgccggctgt  | cgctaccggg  | ggcagacgtt | atcctcgagt | cgaaactatc  | gacggcttcg  | 5880 |
| cctctactct  | cagaccaccg  | atattacggg | tcgggtgggg | ccccggccgt  | gtacttcctg  | 5940 |
| gccatggcgc  | tcgaggcgtc  | ggcggagggt | tttggcgccg | gccggcacac  | gctggaaaac  | 6000 |
| gtgaacttcg  | cgcaccctct  | gatcctttca | gcggagcgcg | acacggctgt  | tcagctcgtg  | 6060 |
| ctttcacaga  | gcgatgaccg  | gcatgcctcg | ttccgcatac | tcagcttgct  | cgacggctcg  | 6120 |
| tggaacttac  | atgctgccgg  | caatattgcc | gcccacgctg | gtgtcgctcc  | cgtgccccga  | 6180 |
| ctggctcgatg | aacgccggcc  | tgccgtggat | ggagacacgt | actattcgct  | gctgcgccac  | 6240 |
| ctcgagatag  | aactggggcc  | gagctaccgc | cgcatacagc | gcattcattt  | cgggtgaacag | 6300 |
| gaagcgctgg  | ccgcgattga  | ttccgcaacg | ccgctcaatc | cccgttgtga  | attggcggaa  | 6360 |
| gccggcctgc  | aattgcttag  | cgccgcggcg | agtcccgcgc | ttgcggatgg  | cgccgaacat  | 6420 |
| ccgatattcg  | ctccgctcgg  | tatcgatcgc | gtttgttttt | acggcagcct  | ggaggggcgcc | 6480 |
| gtatgggggg  | ccgcgcaaat  | tctccggcat | tcgcgggacg | gctttaccgg  | cgaggcgacg  | 6540 |
| ttgctggact  | cggagggctg  | cggtctcggg | gaacttcagg | gcgtgagttt  | ccggcgcgctc | 6600 |
| actcgcgcac  | gggcgcagcg  | ctcggaacgg | aagcccgaat | tgtatgaggt  | cgagtggcgg  | 6660 |
| cccgaaccgc  | tcgcgccagc  | ttcgcgaaac | ctacagcctg | gggcatggct  | gatectggcc  | 6720 |
| gacagtggcg  | gcgcggcccc  | cgctctggca | gatgcgctca | cagctcaggg  | cgagatgtgc  | 6780 |
| gttaccgtgc  | cgcagccggg  | cgagtacatg | tccttagtcg | gtgagcgtga  | ctggcgcggg  | 6840 |
| atcgtcaacc  | tgtacagtct  | cgatgattat | gagctcggct | gccgcagcac  | tctggccctg  | 6900 |
| gtgaagtccc  | tgaagtccgg  | tcgcgggcta | tggctggtaa | cggccggcgc  | gcaggcgacc  | 6960 |
| agtgcgggtg  | acaatcccat  | gcaggccgcg | ctctgggggt | tcggccgggt  | gatcgcgcgc  | 7020 |
| gagcaccggg  | atctgtgggg  | cgggctcatc | gatctggatc | ccgacgatgc  | gcatgcttcg  | 7080 |
| gcggccggcg  | cggccgcgca  | gatgcgtgat | ttcgacggcg | aagatcagtc  | ggcgtggaga  | 7140 |
| agcaaccggc  | gctacgtgcc  | gcgactgacc | cgcgcaccga | gcgcgcgagc  | ggcagtcctg  | 7200 |
| ctggtttcgg  | gcgcgactta  | tttgatcacc | ggcgggctcg | gagccctggg  | acttacagtc  | 7260 |
| gcgaaatgga  | tgggtggagca | cggcgccact | cgcgtcgtgc | tggccggggc  | ccggcctcca  | 7320 |
| aacgaggagc  | agcagcgcgt  | gctgcaacag | attgggtgca | cggcagagac  | ggtcgacgtc  | 7380 |
| agccgggaag  | aagaggctgc  | ggatctcatt | cgcgcacatc | acaccgaaac  | gtcaccgctg  | 7440 |
| cgcggcggtta | tccatgccgc  | gggtgtgctg | gacgacggcg | tactgctgaa  | tcaggactgg  | 7500 |
| acgcggatcg  | caagcgtcat  | ggcgcggaa  | gcggaaggcg | ctgtacacct  | ccatcatcac  | 7560 |
| acccgcgatc  | tgccgctcga  | cttcttcgtg | ctcttttcat | cggcatcctc  | gctcttaggt  | 7620 |
| cctgccgggg  | aggcaggcta  | cgcgcggggc | aacgcggttc | tcgatgcgct  | ggcgcacac   | 7680 |
| cggcgcgga   | tgggtttgcc  | ggcgaccagc | attaactggg | ggcgctggtc  | gggagccgga  | 7740 |
| atggccgcgc  | gcaccagcca  | gtcgatggcc | ggcgtggcga | gcctctccgt  | ggacgagggt  | 7800 |
| ctacacattc  | tcgaggccgt  | cctgcatgaa | tgccccattc | agattgccgc  | gctaccggcg  | 7860 |
| ggctcgatta  | ccggcgagtt  | gctgcgtccc | gccgcgctgc | cttcacctca  | actgcgcacc  | 7920 |
| cgcttgaacg  | aagccacacc  | ccggcgagcg | gaagccatcc | tcattgcgca  | catcaggagg  | 7980 |

|            |            |             |            |            |             |      |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| tactgggcgc | gctttgtcgg | catcgcgact  | tccacaccgc | tcgatccaca | gcagcctttg  | 8040 |
| ggtgaactgg | gactcgattc | gctaattggcc | atagaacttc | gcaactcgct | ctcccaatca  | 8100 |
| ctggggcagc | ctttgcccgc | gagttctgctg | ttcgactatc | cgtcgctcga | tgcgatcgtc  | 8160 |
| agttacgtgc | tccatgcggt | atttccaccc  | gaagcatcac | cggtggaagc | gccggagttt  | 8220 |
| gagaacctcg | cccgcgaaga | actggaagcg  | ctgctcgatt | cgcggtggc  | gcagggtcgac | 8280 |
| cagtggttgg | agacgcaata | a           |            |            |             | 8301 |

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 5292

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 117

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| atgagcgggt  | cagacgatct  | cagcaagctt  | cgccgcgccc  | tgattgcgct | cgacaagggtg | 60   |
| agaaacgca   | tcgaccagct  | ggagagcgcg  | cgcagcgagc  | ccatcgccct | catcggcgcg  | 120  |
| ggctgccgct  | tccccggcgc  | atccaatctc  | gatgcctatt  | ggtcggttgc | gcgcgagggc  | 180  |
| cgcagcgcg   | tacgtgaagt  | tccaccgcac  | cgctgggaca  | tcgatgccta | ctacgatccg  | 240  |
| gatcccggcg  | cgacgggccc  | aatgtacacg  | cggtacggcg  | gcttcatcga | tcagggtgac  | 300  |
| cgttttgacg  | cccggttctt  | cggcatcgct  | ccgcgcgagg  | cgatcagcct | ggatccacag  | 360  |
| cagcggctgc  | ttctggaagt  | cacctgggag  | gcgatcgaga  | acgccgggct | tccacccgac  | 420  |
| cggctggcgg  | ggagccggac  | cggcgtcttc  | atggggatct  | tttccaacga | ttattacaac  | 480  |
| ctgcaaactgc | gcggcgggga  | tgcgcatatc  | gacgcgtaca  | ccggcacggg | caatacggcc  | 540  |
| agcgttgccg  | ccgggcgtct  | ctcgtacatc  | ctcgggctgc  | agggcccga  | catggcgatc  | 600  |
| gacacggcat  | gctcgtcatc  | gctggtcgcg  | gtgcaccttg  | cctgtcagag | cctgcgctca  | 660  |
| ggtgaaagcg  | acctcgcgct  | ggcggggcgg  | gtcaatctga  | ttctctcgcc | ggatcggacg  | 720  |
| atctacttct  | gcaagctgaa  | ggcgatggca  | gccgacggtc  | gctgtaaggc | attcgatgcc  | 780  |
| gcagcagacg  | gctacgtccg  | cggtgagggc  | tgcggtgtgg  | ttgtgctgaa | gcgactctcc  | 840  |
| gacgcgctgc  | gcgatcgcg   | tccgggtgatg | gcgggtgattc | gcggcacggc | aatcaaccag  | 900  |
| gacggacgca  | gcaatggact  | gacggcgccg  | aacgggccc   | cacaggaagc | cgtgatccgc  | 960  |
| caggctgtgg  | gagacgcgcg  | cttgacagcg  | ctggatgtga  | gctatgtcga | ggcgcacgga  | 1020 |
| accggcacgc  | cgctgggcga  | tcccatcgaa  | gccggagccc  | ttgcggccgc | gctgggagcg  | 1080 |
| ggcgaccca   | acggcaacaa  | gctgaagctc  | gggtcggtga  | agaccaactt | cggccacctc  | 1140 |
| gaggcggcag  | cgggcgtggc  | cgcactgatc  | aaggtggcgc  | tgatgctgca | gaacgaagcc  | 1200 |
| attccgcccc  | atctgaatct  | gaccacgccc  | agcccgacac  | tcgattggaa | cacgcttccc  | 1260 |
| ctcgaaatcc  | cggcacggct  | caccccctgg  | ccggttgcac  | ccggcgggcg | gcgcgtcgcc  | 1320 |
| ggcatcaact  | cgttcggctt  | gagcggtaacg | aatgcgcacg  | tgctcatcga | gcaggcgccg  | 1380 |
| caacaggccg  | cgtccagtac  | gcccgcacccg | tacctgcttc  | cgctatcggc | gcgcagtcg   | 1440 |
| gaggcgctgc  | tgatctggc   | gcgcgcatac  | cgcgacgtgg  | tgaacgacaa | ccccgccgac  | 1500 |
| acctgctaca  | cggcgtgcgc  | tgcgcgact   | tcatacgaac  | accgcgcggc | attcaccggg  | 1560 |
| acgaacgcgc  | aggacttgat  | ggccgggctg  | gacagttttc  | tggcgggcaa | cccgaaccgc  | 1620 |
| gataccgcca  | caggttttgt  | gccgcgcggc  | cagaagcgaa  | aagtcgtttt | cgttttgccg  | 1680 |
| ggacaaggat  | cgcagtggcc  | cggcatgggc  | cgcgacctga  | tggcttctga | accggtgttc  | 1740 |
| cgtgccgcca  | tcgaagagt   | cggccgcgcc  | atgcagcctt  | acgtcgactg | gtcgtgacg   | 1800 |
| caagagttgc  | aggggcccgt  | cgaccgcac   | gacgtgattc  | aaccggccct | gttcgcagtc  | 1860 |
| ggggtcgcc   | tggccggact  | gtggcgccat  | tggggaatcg  | agccggacgc | cgtgatcggc  | 1920 |
| cacagcatgg  | gcgaagtgc   | ggcagcgcac  | attgcagggtg | cgctgactct | cgatgaagcc  | 1980 |
| gctcgggtga  | tttgccctgcg | cagccggatg  | ctcgccggag  | tacgcggcca | gggagaaatg  | 2040 |
| gctgtcgtgg  | aattagcgct  | ggacgagggc  | atcgctgcca  | tcgccgggcg | ctcggatcgg  | 2100 |
| gtctcgattg  | ccgccagcaa  | cagcccgcgc  | agcaccgtcc  | tgtcggggcg | cagcgcagct  | 2160 |

|             |            |             |            |             |             |      |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ctgggcgaac  | tgctgcgga  | actggaggcg  | aaagacgtct | tctgccgtcg  | cgtgaaagt   | 2220 |
| gacattgcct  | cgcacagcca | tctgatggac  | tccgtgtgcg | cggcgttgcc  | gggcgtggtg  | 2280 |
| ggagcgcttc  | agccgcggcc | ggccgccctt  | ggcatgtact | ccaccgtcac  | cggcgacagc  | 2340 |
| attagcgggtg | aagagctggt | ttctgcgtag  | tgggctcgta | atcttcgcca  | accctgatg   | 2400 |
| ctgtcgacgg  | ccgtcgccgc | agccgcggcg  | ggtggtcatg | atgtgtttct  | ggaactgagt  | 2460 |
| ccccaccgt   | tgttggtcca | gccgatccag  | gaaacgctcg | gagatcgggc  | agcattgcc   | 2520 |
| gctgcctcgt  | tgcggcgcca | tgaagacgga  | aacctcgcac | tgcgccggac  | gctgggagcg  | 2580 |
| ctgctgacta  | acggagtcac | tccggactgg  | tctcgtattt | atcccaacgg  | cggccaaact  | 2640 |
| cgcgggtgct  | ccaactatcc | ctggcagcgt  | gagcgttatt | ggatcgatat  | ccgtccgccg  | 2700 |
| caggctcgagt | ctcaggcttt | gcctggccgg  | cggatcccgt | cgcgcgtgcc  | ggagatgcag  | 2760 |
| ttcagatcca  | ctgtggaggg | gaaagatttc  | gcggatcacc | ggctgcacga  | tgtgatcgtg  | 2820 |
| actccgggag  | cgtggcacct | ggcaatggcg  | ctcgccgctg | cgcgccaagg  | tctcggcgcc  | 2880 |
| gggcctcacc  | atgtcgaaca | cgtgtcattg  | acgggcgcgc | tgacgctgcc  | ggaaaacgat  | 2940 |
| gctgccaggc  | aggttcaact | ggtactccgt  | catgaagagg | gcggcggagc  | ttccttcgc   | 3000 |
| atctacagcc  | gcgaggattc | ctggaagctg  | cacagcgaag | gcatgctgca  | ggcggggcgat | 3060 |
| tccacggcat  | ccatcgatct | ggatgcgatt  | cgcgcccgct | gcacggcgga  | gctcacagcc  | 3120 |
| gatgccttct  | attcgcgact | gtgggatcgc  | ggctatcact | tccgtccac   | cttccgaacc  | 3180 |
| atcggcccca  | tctggcgcg  | caacgggtgag | gtgctttgtc | gcgtggacat  | tccgctgacg  | 3240 |
| gaaatgcaga  | cgatcgactg | ctgtctgcag  | ttgcccgcg  | ccctcgcca   | tcacgacgat  | 3300 |
| ttgaaagatg  | tgcattgtcc | ggtaggtctg  | gaccgattct | cgctcgctga  | agtgcaccat  | 3360 |
| ggcccggtct  | ggggatacgc | ggtcttgccg  | ccggattcca | cgggtggatgt | ccgtctcgct  | 3420 |
| accggcaccg  | gcagcgtggt | ggcgggaattg | gtggggctgc | agtcgagagt  | cgcccatagc  | 3480 |
| ggccagctcg  | gcgaatcgga | gattcccacc  | tggacgggtg | aatggaccgc  | gtcggttcgc  | 3540 |
| cgcggcgatg  | ccaatgccgg | caatgctggc  | ggacctggc  | tccgtcatcg  | cgagccggcg  | 3600 |
| attgcccagag | ctctgcaaaa | gcgcggccaa  | acctgccgca | cggccgatac  | gtgctcgggt  | 3660 |
| ccgcctgtgc  | gtcaaattgt | gtactgtccc  | tccgcgcgca | tgcacgacct  | gctttccgta  | 3720 |
| ttgcgcagca  | tccgtgcaag | gggctggcct  | gagccgcgcg | gcctgtggct  | gctgacgcgc  | 3780 |
| ggatctgccg  | cggttctcaa | ctccgacaaa  | gatattgata | ttcgacaagc  | ctggctgcac  | 3840 |
| ggaattgggg  | ggacgattgc | ctatgagcat  | cccagactgc | gctgcacgct  | cgtcgatctc  | 3900 |
| gatgcgcaca  | gcaacgactg | cgggcatctc  | gcgacgctga | tgtgtcgaa   | tatcgagag   | 3960 |
| gatcaagtgt  | cgatccggca | aggcacggtg  | tgggcgcgcg | gcctcagtct  | tcacaagatc  | 4020 |
| ccatccgcac  | ccgatgtggc | gttccgtgcc  | gacgcaacct | atctgatcac  | gggcgggctc  | 4080 |
| ggcggactcg  | gactgcaggt | ggcgggatgg  | ctcgccgcgc | ccggagcgcg  | ccatctcggt  | 4140 |
| ctgctgggac  | gcagcgagcg | tccctcgcca  | caactggaag | gtgtcaacgt  | caagatcatc  | 4200 |
| catgcggacg  | tggcggaccg | gcagcagcta  | tccgatgcgc | tccgatcat   | cgatcgcgac  | 4260 |
| atgccgccgt  | tgcggggcgt | gttccatctg  | gcaggcacgc | tggccgacgg  | catgctgctc  | 4320 |
| aatctcacga  | ccgaacgctt | cgaagccgcc  | atggctccga | aagtagccgg  | cgcgtggaac  | 4380 |
| ctgcacgaac  | tcaccgccgg | ccggccgctg  | gatcattttg | ttctcttctc  | ttccgccagc  | 4440 |
| gcgacagtgg  | gatctcccgg | ccagggaac   | tacgccgcgc | gcaattcatt  | tctcgacgcg  | 4500 |
| ctggctcatc  | tgcgccgcgc | ccagggtctt  | cccgcctgca | gcacgcgtg   | gggaccgtgg  | 4560 |
| acacagggtt  | gtttggccgc | acaggcgaac  | cgcggagacc | gtctggccgc  | gcgcggcatc  | 4620 |
| tccggttatt  | aaccgcaaca | gggattgcgc  | gcgctctaca | aagcattgac  | gcagattcgg  | 4680 |
| ccgcacgtcg  | ctgtcatgaa | cttcgatata  | gcgcagtggc | tccgttacta  | tccgtcggcc  | 4740 |
| gcacgatgtg  | ccctgctggc | cggcatcgca  | cccgcggccg | cggacaccaa  | accggcggcc  | 4800 |
| gacatgcgca  | gcgagctcct | ggcagttcca  | gccgggcggc | agcgcgcgcg  | gcggctggaa  | 4860 |
| acgctgctga  | tgcacgaagc | cggacacgtg  | ctgcgcttcg | atccagcgaa  | actcgacggc  | 4920 |
| agagcgacgc  | tgggtgatct | cggattcgat  | tccgttgatg | ccctcgagtt  | tccgaaccgt  | 4980 |
| ctggaagccg  | ggctgcgcgt | caagctttct  | gccaccctga | tctggcgcta  | cccgaatttc  | 5040 |
| tccgccttgg  | cgcagcatct | cgcgcgacaag | ctcggcctgc | cgtgggaaag  | catggccggc  | 5100 |
| aatgctgaac  | cttcgaccgt | tgtcgccgtt  | gctacccttg | ctaccgttgg  | caccgcgcgc  | 5160 |

ggcgaggacc ggagtccegc cgctgcagac gatctcgacg ccgtcgcaaa ccagatcgcc 5220  
gggttggggg acaaagaaat cgaagctttg ttgaaacaga agttcgctca tttttcagga 5280  
gcctccgagt ga 5292

<210> 118

<211> 6462

<212> ADN

<213> bacterie

<400> 118

gtgagttcga tatccgagcg attccccaac cttacgccgt tgcagcaggc gtacctgacg 60  
ctggagcaca tgcagcgacg tctcgatgcg gccgaacgcg acgcgcgcga acccatcgcg 120  
atcgtagggc tgggctgccg gtttccgggc ggcgatgggc ccgatgagtt ctggcagatg 180  
ttgcgcagtg gtagtcgatgc tattcgtgag gtaccgcctg gacgatggga cgaggagtcg 240  
jtccggcgca tcctgaaatc gttgaacccc gccacgcgcg tgaagattca agccggattt 300  
ctcgattcca tccgatggttt cgacaacgat tttttcggca tttcgccacg cgaggccgctc 360  
agcattgacg cgcagcagcg gctgctgttg gaagtggcgt gggaggcact ggaggatgcg 420  
gggcagacga tgggaagggt ctccggcagc cgcacgggcg tcttcgtcgg gatccacagc 480  
caaagcagcg actatttctg gatgcagacc gccgatggcg cgcgcacga tccgtatacc 540  
gccaccggca cggcgcatag cgtgatcgcc ggccgacttt cctatttgct gaacttgcaa 600  
ggaccagca tccgcgtcga cagggcctgc tegtcttcgc tggcggcggt tcatctggcg 660  
tgccagagcc tgcgcagcgg cgagtgtacg ctggccgtgg ccggcggagt gaatctgcgc 720  
ttctcgccgg agtttatgta cgccacctcg aagatgggaa ccgcctcgcc cagcggtcgc 780  
tgccgcgcct tcgacgcggc ggcgagcggc atcgtgttcg gagaaggctg cggcgtggtg 840  
gtgctgaagc gcctgtccga tgcactcgcg gccggagacc ggggtgtggc cgtggtgcgc 900  
ggctccgcgg tcaatcagga tggccgctcg gccgggtcga ccgctcccaa tgcgtgtct 960  
cagcaggtcg tcatccggtc ggcattggcc aatgcgggcg tcgcggcgca gcagatcggt 1020  
tacatcgaag cccatggcac ggggactccg ctccggcgat ccacgagat cgaggcgctg 1080  
gcggaacccg tcggcctccc gcgacctgtc ggcgatgtgt gcgcggtcgg gtccctgaaa 1140  
tcgaacatcg gccacctgga gggagcggca ggcatacgcg gattgattaa agcgggtgctc 1200  
gcattgagtc acgagacgat accgccgagc ttacacgtga gacagctgaa cccgaatatc 1260  
ggttggagg gaacgtcgct cgacattgtg aagggaagtcc ggccgtggcc cgcgggttcg 1320  
agacgaagg ttgcgggcgt cagcgcgttt ggttgggtccg gcacgaacgc gcatgtcggt 1380  
cttgaagaag cggcgccgac tggtagaggc gaagctgcga gcgggttcca tccccgacc 1440  
cccgcgcgg ctgcgcgggc ggctgtcccc ctgcgcggag gggacactgg gggcactccc 1500  
gacattgcag gcaactccga cactgcagac actcccga ctgcagacac tcccgaact 1560  
gcagggactg caggcactgc ggcaactacg ggcattgcag acgcgatgta tgtgcttccg 1620  
ctgtccgcgc atggtgcgga cgaactgcgt cgggtggcgc gggcatacgg ggaattgctg 1680  
acagcgtcgc acgcaccgag cctgcgtgat ctttgctaca cggccgcagt ccgccgcacg 1740  
catcaccgat gccggctcgc tgtttccggc agaacggctg aagaactggc ggcgcagctc 1800  
caggggatca cgatcccttc ccagcgacgg aagacggat tctgtcttctc gggacaggga 1860  
tcgcaatgga tcggaatggg gcgcagctgg atggaccgcg aaccggttat tcgcgaggcg 1920  
ttggaacgct gcgaggccgc catgcccct tatgtggact ggtcgtgaa agaagaactg 1980  
gcgaagctcg accgcgtcga ggtcattcag cctgcgtctc tcgcgctgca ggtcgccatc 2040  
gccgcattgt ggcgttcctg gggaaatcgag ccggatgccg tcatcgggca cagcatggga 2100  
gaggtcgccg ccgctcatgt cgcgggtgcg ctgacgctgc aggatgcggc gcggatcatt 2160  
tgcagccgca gccggctggt gagccggatc agcggcctgg gcgggatggc gatggtggag 2220  
ctgccgctcg cggaatgtga ggccgtgctg tcgacttaca cggaacgact atcgcccgcg 2280  
gtgtcgaacg gacccaactc caccgtcatc tccggtgaag tcgaagccct ggccgaggtc 2340

|            |             |             |             |            |             |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| gtcgcgacgc | tggagcggcg  | aggcgtgtct  | tgccggcccg  | tgaaagtgga | cttcgcccg   | 2400 |
| catagcccg  | aagtggaccc  | attgtgcgac  | gaactcctgc  | agtcgctcga | cgggattcaa  | 2460 |
| ccgcggcccg | cgaccatacc  | tttttactcc  | acggtgaccg  | gcgcgacgct | ggagaccacc  | 2520 |
| agcctcgaca | gcacgtactg  | ggctcgcaat  | ctgcgacg    | cggttctgtt | ctggcagggc  | 2580 |
| atccgccatc | ttgccgacag  | cgggcacgat  | gtctttctcg  | agatcagccc | tcatcccatc  | 2640 |
| ctgctgccc  | ccatcgggcg  | caatgcggcg  | ctggttccgt  | ctctgcgccc | cgaccaggac  | 2700 |
| gaacgcggtt | ccatgctcac  | gtcgtgggc   | gccctctatg  | aggctgggca | cactgtcgca  | 2760 |
| tggcggaccg | tgtacccttc  | cggcaattgc  | gtgcgcctgc  | cccggtatcc | ctggcagcgt  | 2820 |
| cgtcgtttct | ggctcgacgc  | ttcccccgcg  | cgacacgcga  | tcacgttggg | caatccgctg  | 2880 |
| ttgggaaaac | gcgtcgaaagc | ctcgacgcaa  | cccggcactt  | tcttctggga | gacggaactc  | 2940 |
| agtctcgctt | ccgtgccttg  | gctggcagac  | catcgcgtgc  | aggcggaagt | cgtcttgccc  | 3000 |
| gctactgcgt | atctcgatat  | ggctctggcc  | ggaacttccg  | agaccttcgg | tgaaagtccg  | 3060 |
| tgcgtgctgg | agcatgtgac  | ttcacacag   | atgctcattg  | tgccgcgcga | cggcagcatg  | 3120 |
| acgttgacgc | tggccatcgc  | ggctcgataga | cccgggatgg  | cgtcgtttcg | gatttccagc  | 3180 |
| cggcaggcat | cgacatgggt  | cctgcattgt  | tccggggaca  | ttcgtcagac | gcctgcggat  | 3240 |
| gcatcgaccg | tcccgcggga  | ttctgcggag  | acggtgcagg  | cccgtgccc  | cacagtgggtg | 3300 |
| ccggcggcgg | agctgtggcg  | tcagatggcg  | gagcacggcg  | tcgagtatgg | tccggctttc  | 3360 |
| cgcgcgctcg | agcagatctg  | gagttgtcca  | ggtgaggcga  | tcgggcgtct | gcgtagctcg  | 3420 |
| gaaacgcggt | ccactgcgcc  | ggcgttcctc  | gatgcattgc  | tgcagatcat | cgccgcggcg  | 3480 |
| tttggtccc  | ccggtggaac  | ctggctgccc  | gccggcatcg  | accggatgcg | ctggctgcat  | 3540 |
| ccgcacggtt | ccgtggtgtg  | gacgcattgc  | cggctggaag  | gacctatcgc | cgatctgtcg  | 3600 |
| ctgctggacg | gagagggaca  | actggtcgcc  | cgcattcgagg | gtctgcggct | gcagcgccctg | 3660 |
| gatgcgtcgg | agcgcattcg  | catgcgcggc  | tgggtgcacg  | aactgcgctg | ggtcgtctcag | 3720 |
| ccgcacgccg | ctgcagagcc  | gccggcggcg  | cgagcggcgc  | ggtcatggct | cattgtcggc  | 3780 |
| gctgtggata | gcgcgctcac  | cgcattggctg | cgcgctaccg  | gcaaccgcgt | gacgcagacc  | 3840 |
| tcgccggaaa | agctcgatga  | actccagccg  | ccgctcgagg  | aaatcgtgtt | tttgctcgag  | 3900 |
| cacgaaccct | catgcgaccg  | cattctgcat  | ctcctccaga  | ccctggggcg | cacgccctgg  | 3960 |
| cgtcaagcac | cgcgcctatg  | gctggtcacg  | cgcggcgcgc  | agccggtcga | tggacagatc  | 4020 |
| ctgcaagccg | gtatcgctca  | ggcgcctttc  | tggggtttgg  | gccggaccgt | gcattacgaa  | 4080 |
| catccggaa  | tgaactgcac  | gctgatcgat  | ctcgatccc   | ccggcggcga | agaggaaactc | 4140 |
| ctgcacgaac | tgctgacgaa  | caacggcgag  | aatcaaatcg  | cctttcgcgg | cggcgcgcgt  | 4200 |
| tacgtcgcgc | gcgtggctcg  | gcacgaagcg  | gatatgcaac  | ccgccatgtt | caaggccggc  | 4260 |
| gatcggccgt | tccggctcga  | gatcgatgcc  | ccgggagtc   | tcgaccggct | gcgtttgcgg  | 4320 |
| gccacatcgc | gccgcccccc  | gcaagccggt  | gaagtggaga  | ttgaagtctg | cgcgcggggc  | 4380 |
| ctgaacttcc | tcgacgttct  | gctcgccctc  | ggcgttatgc  | ccgacgatgc | gcccggcgcg  | 4440 |
| attgccggca | gcccgcgcct  | gggcggcgaa  | tgcctggggc  | gtatcgtggc | catggggaaa  | 4500 |
| ggcgtcaccg | actttcgcac  | cggagatgaa  | gtcgtggccc  | ttgcgccttg | cagtttcggt  | 4560 |
| cgttctcgta | ccacgcccgc  | cttcgcggtt  | gccttgaagc  | cggccaacat | tcccgcgcaa  | 4620 |
| caggccgccc | ccctgcctat  | cgcgtttctc  | accgccgatt  | acgcgctctc | gcgagcggcg  | 4680 |
| cggctggcgc | ccggcgaaacg | agtcctgatt  | cacgctgcca  | ccggcgggtg | gggattggcg  | 4740 |
| gcaatccaga | tcgcacagcg  | tgcgggcgcg  | gagatcttcg  | ctactgccgg | gagtcgggaa  | 4800 |
| aaacgagcgt | atctgcgctc  | gctgggcatt  | gcgcattgtt  | cggattcgcg | ctcgatggct  | 4860 |
| ttcgtggacg | acatccgcaa  | ttggacgaat  | caagaaggag  | tagacgtcgt | cctgaattcg  | 4920 |
| ctttccggcg | atctgctgga  | ggcgagcttc  | gatctgctgc  | gcgatcatgg | acggttcac   | 4980 |
| gagatcggca | agcgcgatta  | ctatgccggc  | cgcgaagctg  | ggcttcgccc | gttcctgaag  | 5040 |
| aacctctcgt | acacgctggt  | cgatttgctc  | ggcatgtccc  | tgaagcgccc | ggcattgacc  | 5100 |
| cgggagctgc | tgcaggagat  | ggtcgcaaaa  | ttcgaatcgg  | aaacctggcg | gcccctggaa  | 5160 |
| acgcgagtg  | cgaccatcac  | cgaatcgggt  | gaggcgtttc  | gcaccatggc | gcaggcgcg   | 5220 |
| cacatcggca | aaatcgtcat  | ggcgatgcga  | gattgcgcca  | atgcgccc   | cgcaccccta  | 5280 |
| cgtcggcg   | tcgatagcga  | gggaacctac  | ttgattaccg  | gcggacttgg | cgggctcggt  | 5340 |



|             |            |             |            |            |             |      |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| cttaccgtcg  | cacgctggat | gatcggacgc  | ggcgcccggc | ggctggtgct | gctgagccgc  | 5400 |
| cgcgcgcctt  | caccgaggt  | ccagcaagcc  | atcgccgtca | tggacgcaga | tgtccggacg  | 5460 |
| gtgcaggccg  | atgtttctca | gcgcgatgaa  | ctcgagcgcg | tgatctcttc | catcgatcga  | 5520 |
| ttgcgcggcg  | tgattcatgc | cgcagccgtt  | ctcgacgatg | cgctgctact | gaaccagacg  | 5580 |
| gaagcgcatt  | tccgcaacgt | gatggcccg   | aaaatcgacg | gtgcctggaa | cctgcacttg  | 5640 |
| ctcaccgcg   | actgcccgt  | cgatcatttc  | gtgctcttct | cctccgctgc | aggactgctg  | 5700 |
| ggcgcgcccc  | cccagggaaa | ctacgcggcc  | gcgaacgcct | ttcttgacgc | gctggcctac  | 5760 |
| taccggaagg  | cccaaggcct | gccggcgctg  | agcatcggtt | ggggtgctg  | gtcggagggtc | 5820 |
| gggctggctg  | ccgcgcagga | caatcgcgga  | tgcgggctgg | ctttgcgcgg | catggaaaac  | 5880 |
| ctgacgccgc  | aacacggcct | cgctattctg  | gaacagctgc | tgaacagctc | ggcttgccac  | 5940 |
| gtcgccgcga  | tgcccatcaa | tgtccgccag  | tggcggcagt | tctatcccaa | ggcggcgag   | 6000 |
| tctgcaactgt | tgcagctttt | gcatgacgac  | gcggcgagcg | aagccgatgc | gccaaacgcg  | 6060 |
| ttgcgcgcgc  | ggctgcaatc | ggccgagcct  | cagaccgcga | ggacattgct | cgaagaacat  | 6120 |
| ctacagcagc  | agctggcgcg | cgtgctgcgc  | atcgactctc | aaactatcga | tcccctgcgc  | 6180 |
| cgcgtgaagg  | aactcggcct | cgattccctc  | atggccctgg | agtttcgcaa | ccgtctcgaa  | 6240 |
| ctcacactgg  | gtctcacgct | ccccgcgacc  | ctgatttggg | gtcatcccac | gctggccggt  | 6300 |
| cttgccccgc  | acctggcgct | gcaaattggga | ctgccgctgg | tgaagcgca  | ggccgcggct  | 6360 |
| gctgcggaag  | gagacagccg | cgccatgaaa  | actgcactca | gcgggttgga | cgacatgtcg  | 6420 |
| gaagaagcag  | ccgtggctgc | gtcccgagga  | gcaaggctcg | ga         |             | 6462 |

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 5088

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 119

|             |            |            |            |             |            |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| gtgagggaaa  | aaattgcgcc | catgtcgtcg | gtcaaactcg | cgctattggc  | gcggaacatg | 60   |
| cggcaaaaaca | tgcagggctt | cgacctgggt | cacgccgaac | ccatcgccat  | cgtcggcatg | 120  |
| gcgtgtcggt  | ttccggggcg | cgcgagaat  | ccggacgcct | tctggacgct  | ggtgaagaac | 180  |
| ggtgtcgacg  | gtgtcaccga | ggtgccgcca | gaccgctgga | actcggacca  | gtactactcc | 240  |
| tccgatcccc  | atgctccggg | caaggcgtat | gcgcgatatg | ccgccttctc  | cgaacgcatt | 300  |
| jacgggtttcg | atgcggaatt | cttcggcatc | tccccccgcg | aagctctgaa  | catggatccg | 360  |
| cagcagcggc  | tgtgtctgga | agtgtgctgg | gaagcggcag | aggacgccgg  | catctctccc | 420  |
| ggccctctgg  | cgggcagcgc | gaccggcgtc | tttgccggct | cctgcgccc   | ggacttcgga | 480  |
| ctgtttcagt  | acgccgacce | tgcccgcatc | ggagcttggt | cgggttcggg  | cgtggcgcat | 540  |
| agcatgttgg  | ccaatcgcat | ctcctatctg | ctcgacctgc | gcgggtccgag | catggcggtc | 600  |
| gatacggcct  | gtcctccgc  | gctcgtcgcc | gtccatctgg | cttgccaaag  | cctgcgccc  | 660  |
| cgcgaatgcg  | atgcggcatt | cgccggcgga | gtgaacttga | tcctgactcc  | cgagggcatg | 720  |
| atcgctttgt  | cgaaggctcg | catgttggtg | cccgcaggac | gctgcaagac  | gttcgacgcc | 780  |
| gcagccgacg  | gttatgtgcg | cggcgagggc | tgcggcatcg | tgctgctgaa  | gcggctctcc | 840  |
| gatgcgctgg  | ccgatggcga | tgccatccgt | gcagtcaccc | gcggctcggc  | aatcaatcag | 900  |
| gacggacgga  | gcaatggcat | cacggcgccg | aatctgcagg | cgcagaaggc  | ggtcctgcaa | 960  |
| gaggcggtgg  | ccaacgcgca | catcgatcca | tcccacgtat | cgttgatcga  | ggcgcgatgg | 1020 |
| acgggcacgt  | cgtcgggcga | tcctatcgag | atcgaggccc | tgcagtcggt  | ctacgacgcg | 1080 |
| ccggactctg  | cgccttgtct | gctgggttcc | gtaaagacca | acatcgggca  | tctggagggc | 1140 |
| gcggcgggaa  | tgcgcgggct | gatcaaagcc | gtactcgccc | tgcagcatcg  | caccattcct | 1200 |
| ccgcacctgc  | attttcgcgc | gctgaatccg | aacatctcac | tggacggcag  | ccggtttcgc | 1260 |
| atcgccacgg  | aatcgtcgcc | gtggacgtcg | gaaggacggc | cgcgtctggc  | cggcgtcagc | 1320 |
| tcgttcgggt  | ttggaggagg | caacgcgcac | gtcatcctcg | aagaggcgcc  | tgcactccct | 1380 |

|            |             |             |             |             |            |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| ttgccgaagc | cggtcacacg  | ccgcgagctt  | ctcactctgt  | cggcgcgcac  | cgacgaagcg | 1440 |
| ctcggcgaac | tggccggcca  | cttcgcggag  | ttcctgcagt  | cgcacccgaa  | tgcgttgctg | 1500 |
| tccgacgttt | gcttcaccag  | tcagggttggg | cgcgacgcat  | atagtcaccg  | cttggcgatc | 1560 |
| accgccgcag | atgcggcaga  | ggctgtagcg  | gcattggccg  | cggcgccgcg  | gcgcgaagta | 1620 |
| tcgttgcgcc | ggcgggccggc | aatcgctttt  | ctcttcaccg  | gccagggcgc  | gcagtacgcc | 1680 |
| ggcatggggc | cagagcttta  | taaaacgcag  | cctgtttttc  | gcgacgcgct  | cgatcgttgc | 1740 |
| gccgattggc | tccgtcccca  | gctcgatggt  | ccgctgaccg  | ttctcttggt  | cgagtcgggt | 1800 |
| tcgccgttgc | acgagacggc  | gtatacccg   | ccggcaatgt  | ttgccctgga  | atgggctctg | 1860 |
| gctcagttct | ggctgtcgct  | cggcgctccg  | ccggactacg  | tgctgggcca  | cagtctcggc | 1920 |
| gagtatgttg | cggcggtgtg  | ggccggcgcc  | tttagcgtag  | aggacggcct  | gcggctgggt | 1980 |
| accgccaggg | ggcggtgggt  | caatgcgctt  | ccccgcggca  | aagcggtcac  | cgttcacgcc | 2040 |
| aatccgagcc | gcacgcgggc  | gctcgccgcc  | aaggtggcag  | tcgccgcac   | gaatgcgccg | 2100 |
| gaccgcaccg | tgatctccgg  | cacggctgca  | gaaatcgcg   | aagcgcaaga  | tgacctgcac | 2160 |
| cgcgcggcg  | tggaaacgcg  | agagctgaac  | gtatcgcatg  | cgttccattc  | gccgctgatg | 2220 |
| gatccgattt | tggacaagtt  | cgaagcgctt  | gcagggtgca  | tcgcgtatca  | gccgctggcg | 2280 |
| atcccgtctg | tgtcgaaagt  | cagcggagcc  | gtattgccga  | aaggcacgac  | actcgacgcc | 2340 |
| cgctactggc | ggcgacagtt  | gcgcgaaacc  | gtgcagtttg  | aaagcgcgat  | gcgaaccctg | 2400 |
| gcggacgcg  | agtgcgaagt  | gtttctggaa  | atcggcccg   | atcccacgct  | caccacgctg | 2460 |
| ggcgatatt  | gtctgcccga  | tgacggcgcg  | gtctggctgc  | actccctatc  | taagggacga | 2520 |
| tcggattggg | ccgtgctgct  | ggaaagtctt  | ggcggcctgt  | ttaccgcggg  | cgtgaatccc | 2580 |
| gactggcgcg | gtctctatgc  | cggggaatca  | cccagcccg   | tcgcgctgcc  | gacgtatccg | 2640 |
| tttcagcgtg | acaccttcag  | cctgagacgc  | gtacccgcga  | gagagccggc  | gcgcggcgcc | 2700 |
| atgttggggg | cgcgcctcaa  | cagcgcgttg  | ggcgaatgtc  | tcttcgaaaa  | ttcgctaacc | 2760 |
| acggagacgc | ctctgctcca  | tgagcacgtg  | atctacgacg  | cggtcattgt  | gcccggcgcc | 2820 |
| tggcacgtgt | cggcatttct  | cgaagcgcca  | caggaagtct  | tcggctccgg  | tccctgcgcc | 2880 |
| gtctccgatg | tcacgatgcg  | gcaggcactg  | gccatcccg   | cggatacgcc  | ggtcacgggt | 2940 |
| caagcgattg | tcacaccccg  | cgaggacggc  | gaagcaaagg  | tgacaggtct  | cagccaggat | 3000 |
| ggcgattcgt | ggaagctcca  | cacggcagcc  | agtctgcgcg  | cggcgactgc  | cggcgccggt | 3060 |
| catttcgagc | tgccggcgca  | gccttcgcaa  | gtcatttccg  | gcgatgcggt  | ctacggcgcg | 3120 |
| atgaacgcac | gcggcgctca  | tcttgggccc  | gccttcagtt  | gggtggaaga  | agtctggcgt | 3180 |
| cgcgatggcg | aggcgctggg  | gcgaatgcgt  | ctgccggtgg  | ctgaggatgg  | cgcgaaacgt | 3240 |
| taccggctgc | accccgccct  | gategattct  | tgttttcaag  | tattcgagac  | gacttggccc | 3300 |
| gcggagcgtt | gccagcccgg  | cgcatacgtg  | ccggtcggga  | tcgaagcggt  | gcgttcttac | 3360 |
| cgctccgcgg | caggttctct  | gcgctgtcat  | gcgcgtctgc  | gcccagagctc | gagcggcccc | 3420 |
| ttcgctcggt | atctgacgct  | ggttgaagag  | accggcgcg   | tcacgcgcga  | gttttccgga | 3480 |
| ctggctgtaa | tgcatgccgg  | tacgctgcaa  | tccgcacagt  | cgtggctgca  | ggatgtgcag | 3540 |
| tggcaggagt | gcgagcgatc  | gacaacggtg  | aagtccgacg  | gccctggcaa  | gccggaggac | 3600 |
| tggttgctgt | gtgccggcgc  | agacgatgtc  | gccggtttga  | tgccgcaaga  | gctgcgcgtc | 3660 |
| gtgtccggcg | tactctccg   | ccaggcgctg  | gaacagaccc  | agactttggt  | cggccgcccc | 3720 |
| gcgcggctct | ggctgatcac  | gcgcggcgctg | catcgcatca  | gtgatgacga  | tgcgactccc | 3780 |
| gtcgatccct | tccaggctcc  | actgtgggga  | ctcgggcagg  | cgatcgcgcg  | cgagcatccc | 3840 |
| gagctgtggg | gcggcctgat  | cgacctcggt  | tgcgacaatg  | ccgacatcgc  | cgccgccatg | 3900 |
| ctgctggatg | aaatccgtta  | tgcggcgac   | gacaaagcga  | tcgcattgcg  | caacggacgc | 3960 |
| cgtacgttc  | gcgggtgggt  | gcggcacaag  | gaaacgtcga  | agcggccgcc  | tgccatttca | 4020 |
| gccgacggcg | tctatctgat  | caccggcggt  | ctcggcgcat  | taggacgaag  | ggtggcacgc | 4080 |
| cgcttgatcg | agcaaggcgc  | gcgcgctctg  | gtactgggtcg | gccggcatac  | ggaggcagtt | 4140 |
| gccgatctcg | agcaactcgg  | ggctgcagtc  | atgggttgcg  | cttgcgatgt  | gagttccgag | 4200 |
| caacagctgg | cggcgctgct  | ggcggacccg  | cgcacccagc  | cgctgcgtgg  | agtcgtgcat | 4260 |
| gccgcaggcg | tgctcgatga  | cggggtagtt  | acagaacaga  | cgtgggctcg  | tttcgagaag | 4320 |
| gtgctggcgc | cgaagctgca  | gggtgcctgg  | aatcttcacc  | agctcactcg  | ccaccatgcy | 4380 |

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| ctcgactttt | tcgtactctt | ctcttccgcc | gcttcgctgc | tcggttccgc  | cggacagagc | 4440 |
| aattactcgg | cggccaacgc | atttctcgac | agccttgccc | acatgcgccg  | cgcgcaagga | 4500 |
| ctaccggcgc | tgagcatcaa | ttggggacca | tgggcgggcg | aaggcatggc  | cgcgcgcatc | 4560 |
| gcgcggcaag | gcctgccggg | ggtaccgctg | ctgccgccgg | aagtgggtgc  | gcgcactctt | 4620 |
| ggcgatctgc | tgggcgagac | tgccgctcag | atcgcggtgt | tccaagtctc  | cgccgaaaaa | 4680 |
| aggcggagcc | cggcgagcga | tcccggcttc | atccagcaac | tcaccgaagc  | tgcgcgggag | 4740 |
| cggcggcagg | aactgctgca | gatgcgcctc | cgcaagcagg | ccggcgggcg  | gctggcgctc | 4800 |
| gatgcgtcca | agacgctcga | cccgcgccgg | ccgctcaagg | aatacggaact | cgattcgctg | 4860 |
| atggcgctgg | atctggcgcg | cgccatcgga | gagctggtgc | gcaagagcct  | tcccgcgaca | 4920 |
| ttgctatacg | accatccgac | cgtcgagaaa | ttggccggcc | atgtcctccg  | cgaactcgga | 4980 |
| ctcgacgtcc | ccagcgattc | cctcgctcat | gaagtgcggc | agctgtccga  | gcaggagatg | 5040 |
| gcggcggtca | tcacggaaac | cttgccacat | ctgggagagg | aacgatga    |            | 5088 |

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 4306

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 120

|             |            |            |            |             |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| atgagcgatc  | tcactcctct | tcaacaggcg | gtcctggcgc | tcaagcgcac  | gcgagcgcg   | 60   |
| ctcgacgaac  | tggagagcgt | ccacaacgaa | cccatcgcca | tcgtcggcat  | ggcttgccgc  | 120  |
| tttcccggcg  | cggactcgcc | ggaagcattt | tggcagctcc | tgcacgatgg  | catcgatgcc  | 180  |
| atcccgcaaa  | ttcctgcggg | ccgttgggat | gccgatgcgt | tttacgatcc  | cgatcccaac  | 240  |
| gcgccgggaa  | agatgtacac | gcgtctgggc | ggattcctcg | atgggtgccgt | cgacggcttc  | 300  |
| gacgccgggt  | tcttcggaat | cacgccgcgc | gaggtcgccg | gtctggatcc  | gcagcagcgc  | 360  |
| ctgctgctcg  | aggtggcatg | ggaagctttg | gagcgtgcgg | gtcggccgcc  | cgacagtctc  | 420  |
| gcggggcagcg | acaccggagt | gttcacgcgg | atcagcaccg | acgactacag  | ccggctgaaa  | 480  |
| cctaccgatc  | cggcgctcat | tgacgcctat | accggtagcg | gaaccgcgtt  | cagcactgcc  | 540  |
| gccggacgga  | tctcctatct | gctgggggtg | cagggaaccg | acttcccctg  | cgacacggcg  | 600  |
| tgtcttctct  | cactcgtggc | ggttcatctg | gcgtgcgcga | gcttgcatgc  | gcgagagtgc  | 660  |
| agcatggcgc  | tggccggcgg | cgtgaacctg | attctggcgc | cggaaagcac  | gatctacttc  | 720  |
| gccgcctgc   | gggccatggc | ggccgatggc | cgttgcaaaa | gtttcgctgc  | ctccgcgcgc  | 780  |
| ggttacggcc  | gcggcgaggg | atgcggaatg | ctggtgctga | agcggctgtc  | cgatgcgacg  | 840  |
| cgtgacggcg  | atcgtattct | ggcgctgatt | cgcggatcgg | ccgtcaacca  | cggcgggccg  | 900  |
| agcaacggcc  | tcacggcgcc | gaacggtccg | gcgcaggaag | ccgtgattcg  | ggcggcgctc  | 960  |
| aagaacggcg  | gcatggcccc | cgccgatgtc | gattacgtgg | aagcccacgg  | aaccgggacg  | 1020 |
| ccgctgggag  | atcccatcga | actgcggggc | atggcagcgg | tgctgggcca  | ggggcggtgc  | 1080 |
| gtcgattctc  | cgttgatcgt | cgggtcggtg | aaaaccaact | tcggccacct  | ggaggcgggc  | 1140 |
| gcaggtatcg  | ccggcctgat | caagaccatt | ctcgccctgc | agcaccgaga  | gattccgccc  | 1200 |
| catctgcatt  | tcaacgcgcc | caacccgcac | gtactctgga | atgagctgcc  | gctaaagata  | 1260 |
| gccaccgcat  | gttcgccatg | gccctccaac | ggccgcccc  | gagttgccgg  | ggtgagctcg  | 1320 |
| ttcggaatca  | gtggcaccaa | ttcgcacgtc | gtcctcgag  | aagcgaagac  | gaatgtagaa  | 1380 |
| gcgaagacga  | atgtagaggc | gaagacgaat | gtagaggcga | agacgagtga  | agagggtcaag | 1440 |
| gcgagtgtag  | aggccaaagg | gaatgtggag | gctaaggcta | gtgctagtgt  | ccccctctc   | 1500 |
| gagggggaca  | gccgcccgcg | aagcggcggc | gggggggtcg | gccggccgcc  | cagccgcgag  | 1560 |
| gaagtgcggg  | tcccgatca  | actccatgcc | gaagacggcc | gcgaatacct  | cctaccgctt  | 1620 |
| tcggcgcgcc  | atccgcaggc | tctgcgcgat | ctcgccggcg | cctatcgcca  | tgggcgcttt  | 1680 |
| cacgctccgc  | tctccgcgct | gtgttccgcc | gccagcctga | cgcgcagtca  | ctacgaacat  | 1740 |
| cgcgcagcgt  | ttgtggcctc | atccctgccc | gagttcaatc | aattgctcga  | ggccttccgg  | 1800 |

cgcaatgaaa ccaatcgcgg cgtcgccacc ggtttcgccg atccccgagt tcgtccgaaa 1860  
ctcgcccttca tcttttccgg ccagggcgga cagtaccgcg gcatggcgta tcgcctgtat 1920  
tccgacgagc ctgtcttccg atcggcgacg gaacgttgcg acgcccctt ccgcagcttc 1980  
gtggaatggc ggcttgcgga cctgctcgcc gacgagtcgg gagcatggct gagccagatc 2040  
gatcgcgtag agcctgcgct gttcgccggt caaatcgcgc tggtcgaact gctgcaatcc 2100  
tggggaattc gcccgagcgg cgtggccgga cacagcatgg gagaagtggc ggcggcccat 2160  
gtcgcaggca ttctcaccct ggaggacgcg gcccgcacga tctgtcgccg cagccggctg 2220  
ttgctcggac ttcgcgcccg gggagcgatg gctctggtcg aactgccgct cgatcgggcg 2280  
aaggccgtgc tcgctgaacg cggctctact actgtttctg tcgcggccag caacggacca 2340  
cgcagcacgg tggtctcggg agaccgtgtg gctctcgagc atttgaagga cgacttcgag 2400  
aggcgcgggc tcttctgccc gctgattcag gtggatgtcg cttcacacag ctcgagggtg 2460  
gacccgctcg agaacgaatt gcgccaggaa ctcggccgcg ttattgcaaa acgttccgcc 2520  
gtgccgttct tctccacggg tgaaggacag ttgagcacgg gcgaggcggtg cgacgcgtcg 2580  
tactgggtag ccaatctgcg acagccagtc cgtttctggg agtcgttgca ggcgatggct 2640  
ggatgatgag tcacgcagtt cctggagatc agtccgcac ctgtgctgac gccgtcgatc 2700  
gaggatagtc tgcggacgct cggcataaac ggactggttc gcccgtact gcgcgcgcgac 2760  
gaaccggagc ggcgtgagct gctcgagttg ctcgcgcgcg tctacgtgaa tgggcagcgt 2820  
ccggactggc gcgcgctcgc ttcgtctccc gacacgcgcc tggatctgcc gacgtatccc 2880  
tggcagcgcg agcgttctg gttcgcgacc tcgacgcggc gaagtttgcc ggcagttggc 2940  
ggatcatccg tgcctcggtcg caaggtcgag attgcgctgg cgcgggacac acacgtctgg 3000  
gagtcggtgc tctctctgga tgcgtgccc tttctcgccg atcaccggct caacgagctt 3060  
gtggtgcttc ccggtgccc ttatgtggag atggcgctgg ccgcagccaa ggaagtgttc 3120  
gcgggtggct gcagcctgga agagatccgg tttgaacaaa tgctggttgt tccttccgcg 3180  
ggcgctcgc gagtgaggt catactcgag ggacacgcat tccgcatctc cagtctggcc 3240  
gaaggcggtt ccgattggac cgagcacgcg cgcggcacca tggctgcggc gccggacaag 3300  
gtcgcgccca cggtagcct gccacactt ggggatcgca tcgagggcga tgacttctat 3360  
gcggccttcg catcgcaggg gatgcattac ggcgacacct tccgcggcat cgcggaagtg 3420  
tggcgggcgcg acggcgaggc agtggcgcgga ctgagcgtgc cggatgccgt tcgcgaagca 3480  
gagtcgggtt acacgcttca tcttgccttg ctcgatgcct gtttgaggt gctgggcgcg 3540  
acgcttggcg gcgaaggcag cgccggctct tgcgtgcctg tcgccatcga acggttgca 3600  
tgtttcggca gaccgcggcg cgatcttagg gtgcatgcgc ggctgacggg gcggctcgag 3660  
ggcgatgtca ccctgtgtga tgcggaaggc cacgtcatcc tcgaggtcca aggcctgcgt 3720  
gcccaggaac tggagcgcca atccgaatgg ttccacgcta tggaatggga gccgcagctg 3780  
ctggccgaga gtccaacggc aacggtgtcg ggtgcatggc tggtcattgc cgatgccggc 3840  
ggcatcgag ccgcgggtgg gcgagggctg ggcacaaaca cggttgatgat ttcgggtcgc 3900  
gatgccgaga taccggatca gccttaccgg ggcgtcattc actgcgggag cctggatgag 3960  
accgaggatg agaccgatcc gtcggctgcg gggggaaccg cctgcgaaga cattttgcgc 4020  
atcgttcaag aattcgaggt gggacgcata cagctgacga aacaagcgtc cgacgccgaa 4080  
tcgcagcatc cgcgaatctg gctgattacg gcggcggttc atgcggagca tctgcagatg 4140  
ccggtgggtg ccgcgcgggc accggtgtgg ggtctgggac gtaccatcgc ggccgagcat 4200  
cccaggttcg cttgcacctg catcgatctc gacactgccg gtgaagtcga ggtgcaggcg 4260  
ctctgccgag agattctcgc ggggagttct gaacgtcagg gcccgg 4306

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 1537

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 121

Leu Gln Cys Pro Glu Ser Ala Val Asp Leu Gln Gln Pro Leu Val Arg  
1 5 10 15  
Met Gly Leu Asp Ser Leu Met Ala Val Gln Leu Arg Asn Arg Ile Asp  
20 25 30  
Thr Asp Leu Arg Val Leu Leu Pro Met Val Arg Phe Leu Asp Gly Pro  
35 40 45  
Ser Val Ala Glu Leu Ala Arg Asp Leu Ser Asp Leu Ser Gly Leu Ser  
50 55 60  
Glu Arg Thr Thr Val Ala Pro Glu Pro Ala Ala Gln Ala Ser Val Pro  
65 70 75 80  
Ala Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Ala Gly Gln Gln Ala Leu Trp Phe Ile  
85 90 95  
Tyr Arg Ser Ala Pro Glu Ser Pro Ala Tyr Asn Ile Ala Trp Ile Ala  
100 105 110  
Arg Ala Arg Gly Ala Phe Asp Pro Gln Ala Leu Arg Arg Ser Leu Gln  
115 120 125  
Asp Leu Val Asp Arg His Pro Ala Leu Arg Thr Thr Ile Ala Glu Ser  
130 135 140  
Gly Gly Ala Pro Val Gln Thr Val His Ser Ser Val Pro Val Asp Phe  
145 150 155 160  
Glu Val Ile Pro Cys Ser Pro Asp Asp Glu Ala Val Leu Ile Asp Gly  
165 170 175  
Val Phe His Ala Pro Phe Asn Leu Gly Glu Asn Cys Phe Arg Ser Arg  
180 185 190  
Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Asp Gln Val Leu Ala Ile Val Val His  
195 200 205  
His Ile Leu Ala Asp Phe Trp Ser Leu Leu Val Met Val Asp Glu Leu  
210 215 220  
Arg Ser Ile Tyr Leu Ala Arg Thr Ala Gly Gly Pro Pro Val Ala Pro  
225 230 235 240  
Pro Val Ala Ser Phe Ala Ala Phe Val Arg Trp Gln Asn Glu Leu Leu  
245 250 255  
Ala Gly Thr Glu Gly Glu Arg Leu Trp Asn Tyr Trp Ser Ser Gln Leu  
260 265 270

Ser Gly Gln Leu Pro Val Leu Asn Leu Pro Ser Asp Arg Pro Ser Pro  
275 280 285

Pro Val Gln Ser Phe Arg Gly Asn Ser His Ser Phe Arg Ile Glu Pro  
290 295 300

Ala Leu Thr Ala Lys Leu Lys Ala Leu Ala Arg Arg Gln Asn Ala Thr  
305 310 315 320

Leu His Ala Thr Leu Met Ala Ala Phe Gln Val Leu Leu Ser Arg Trp  
325 330 335

Thr Ser Gln Glu Glu Ile Leu Thr Gly Thr Leu Thr Asn Gly Arg Thr  
340 345 350

Gln Pro Glu Phe Ala Asp Leu Val Gly Tyr Phe Val Asn Pro Val Ile  
355 360 365

Leu Arg Gly Glu Leu Ser Gly Asp Pro Asp Phe Asn Thr Val Leu Ala  
370 375 380

Arg Ile Arg Gln Thr Leu Leu Gly Ala Ile Glu His Gln Glu Tyr Pro  
385 390 395 400

Tyr Ala Arg Ile Val Glu Arg Leu Gly Pro Gly Leu Arg Val Leu Phe  
405 410 415

Val Leu Gln Gln Pro His Arg Ile Pro Glu Ser Val Pro Phe Met Leu  
420 425 430

Gly Gln Ser Gly Gly Arg Met Ala Trp Gly Ser Leu Thr Leu Glu Ser  
435 440 445

Leu Ala Met Pro Leu Arg Gln Ser Arg Phe Asp Leu Asp Leu Met Met  
450 455 460

Val Glu Thr Asp Gly Gly Leu Ser Ala Phe Leu Gln Tyr Asn Thr Asp  
465 470 475 480

Ile Phe Asp Ala Ala Thr Ile Glu Arg Leu Ser Leu His Phe Ala Val  
485 490 495

Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asn Pro Ala Cys Pro Val Val Asp Leu  
500 505 510

Pro Leu Leu Thr Thr Arg Glu Arg Ile Gln Leu Leu Glu Glu Trp Asn  
515 520 525

Ala Thr Ala Ala Glu Phe Pro Ser Gln Cys Val His Glu Leu Phe Glu

| 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Gln | Val | Glu | Leu | Thr | Pro | Asp | Ala | Ile | Ala | Leu | Ser | Phe | Gly | Glu |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gln | Asn | Leu | Thr | Tyr | Arg | Glu | Leu | Asn | Gly | Ser | Ala | Asn | Arg | Ile | Ala |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| His | Tyr | Leu | Arg | Ser | Arg | Gly | Ala | Gly | Pro | Gly | Glu | Met | Val | Gly | Ile |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| His | Val | Thr | Arg | Ser | Leu | Glu | Thr | Val | Ala | Gly | Leu | Leu | Gly | Val | Leu |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Lys | Ala | Gly | Ala | Ala | Tyr | Val | Pro | Leu | Glu | Pro | Glu | Tyr | Pro | Ala | Gln |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Arg | Leu | Arg | Leu | Met | Leu | Glu | Glu | Thr | Arg | Pro | Val | Val | Val | Leu | Asn |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Val | Thr | Glu | Ser | Glu | Val | Trp | Thr | Gln | Pro | Asp | Thr | Asn | Pro | Asn | Pro |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Leu | Ala | Thr | Pro | Ala | Asp | Leu | Ala | Tyr | Val | Leu | Tyr | Thr | Ser | Gly | Ser |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| Thr | Gly | Arg | Pro | Lys | Gly | Val | Gln | Ile | Thr | His | Gln | Ala | Val | Val | Asn |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Phe | Leu | Ser | Ser | Met | Arg | His | Glu | Pro | Gly | Ile | Ser | Asp | Arg | Asp | Thr |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Leu | Leu | Ala | Leu | Thr | Thr | Phe | Met | Phe | Asp | Ile | Ser | Ala | Leu | Glu | Ile |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |
| Phe | Leu | Pro | Leu | Ser | Ala | Gly | Ala | Arg | Val | Val | Val | Ala | Asn | Gln | Glu |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Thr | Ala | Val | Asp | Gly | Glu | Arg | Leu | Ala | Arg | Glu | Leu | Ala | Arg | Ser | Lys |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Ala | Thr | Met | Met | Gln | Ala | Thr | Pro | Ala | Thr | Trp | Arg | Leu | Leu | Leu | Ala |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Ser | Gly | Trp | Pro | Gly | Asp | Arg | Arg | Leu | Thr | Ala | Leu | Cys | Gly | Gly | Glu |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Pro | Arg | Asp | Leu | Ala | Asp | Arg | Leu | Leu | Gln | Arg | Thr | Ala | Ala |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |

Leu Trp Asn Leu Tyr Gly Pro Thr Glu Thr Thr Ile Trp Ser Ala Ile  
805 810 815

Gln Arg Val Thr Thr Gly Asp Gly Pro Val Ser Ile Gly Arg Pro Ile  
820 825 830

Ala Asn Thr Gln Leu Tyr Val Leu Asp Asp Arg Met Gln Pro Ala Pro  
835 840 845

Ile Gly Val Ala Gly Glu Leu Tyr Ile Gly Gly Ala Gly Leu Ala Arg  
850 855 860

Gly Tyr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ser Ala Asp Lys Phe Val Ala Asn  
865 870 875 880

Ser Phe Asp Pro His Gly Thr Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Asp Leu Ala  
885 890 895

Arg Arg Gln Arg Asp Gly Ala Leu Glu Tyr Leu Gly Arg Ile Asp His  
900 905 910

Gln Val Lys Ile Arg Gly Phe Arg Ile Glu Thr Gly Glu Ile Glu Ala  
915 920 925

Ala Val Arg Ser His Pro Ala Val Arg His Ala Val Val Thr Ala Arg  
930 935 940

Glu Asn Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Ile Val Pro Leu  
945 950 955 960

Ala Asp Gly His Arg Ala Thr Ala Ala Ala Asp Thr Phe His Asp Arg  
965 970 975

Val Glu Ser Glu His Val Thr Gln Trp Gln Ser Val Trp Asp Thr Thr  
980 985 990

Tyr Glu Gln Asn Ala Pro Asn Ala Asp Pro Glu Phe Asn Ile Val Gly  
995 1000 1005

Trp Arg Ser Ser Val Thr Gly Glu Pro Ile Pro Ala Ala Glu Met Arg  
1010 1015 1020

Glu Trp Val Gln Asp Ser Val Asp Arg Ile Leu Ala Ser Arg Pro Arg  
1025 1030 1035 1040

Arg Val Leu Glu Ile Gly Cys Gly Thr Gly Leu Leu Leu Phe Arg Val  
1045 1050 1055

Ala Pro His Cys Ser Glu Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Ser Gln Lys Ala  
1060 1065 1070



Leu Asp Tyr Ile Ala Ala His Ala Asp Arg Thr Gly Leu Ala Asn Val  
1075 1080 1085

Arg Thr Phe Arg Gln Ala Ala Asp Asp Ala Cys Glu Ile Asp Ser Arg  
1090 1095 1100

Ser Cys Asp Ala Val Val Leu Asn Ser Val Ile Gln Tyr Phe Pro Gly  
1105 1110 1115 1120

Glu Ala Tyr Leu Arg Arg Val Leu Ala Glu Ala Val Arg Val Val Lys  
1125 1130 1135

Pro Gly Gly Ile Val Phe Val Gly Asp Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu  
1140 1145 1150

Glu Thr Phe Tyr Ala Ser Leu Glu Val Gln Arg Ala Pro Ala Ser Leu  
1155 1160 1165

Thr Arg Asn Glu Phe Arg Gln Arg Val Arg Ser Leu Ala Ser Gln Glu  
1170 1175 1180

Glu Glu Leu Val Val Asp Pro Ala Phe Phe Phe Ala Leu Arg Glu Gln  
1185 1190 1195 1200

Ile Pro Glu Ile Gly Arg Ile Glu Ile Leu Pro Arg Arg Gly Arg Ser  
1205 1210 1215

His Asn Glu Leu Thr Arg Phe Arg Tyr Gln Ala Ile Leu His Ile Gly  
1220 1225 1230

Ser Arg Glu Ala Glu Glu Pro Glu Ser Asp Arg Arg Arg Cys Gln Thr  
1235 1240 1245

Ala Ala Glu Ile Arg Arg Val Leu Thr Asp Ala Gln Pro Glu Leu Ala  
1250 1255 1260

Ala Phe Thr Glu Ile Pro Asn Ala Arg Leu Thr Ala Glu Ser Ala Ile  
1265 1270 1275 1280

Val Thr Trp Met Asn Gly Asp Glu Ala Pro Glu Thr Leu Gly Glu Leu  
1285 1290 1295

Arg Asp Arg Leu Arg Gln Thr Ser Pro Ser Gly Val Asp Pro Ala Asp  
1300 1305 1310

Leu Trp Arg Met Asp Glu Asp Leu Pro Tyr Arg Val Ala Ile Asp Trp  
1315 1320 1325

Ser Ser His Gly Pro His Gly Arg Phe Asp Ala Thr Phe Cys Arg Ala

1330                      1335                      1340

Ala Ala Gly Pro Pro Ala Ser Arg Pro Arg Arg Arg Leu Ala Gly Pro  
1345                      1350                      1355                      1360

Tyr Thr Asn Asp Pro Leu Arg Ala Val Tyr Thr Arg Thr Val Val Pro  
                    1365                      1370                      1375

Gln Leu Arg Thr His Leu Lys Glu Lys Leu Pro Asp Tyr Met Ile Pro  
                    1380                      1385                      1390

Thr Ala Trp Val Val Leu His Glu Met Pro Leu Thr Pro Asn Gly Lys  
                    1395                      1400                      1405

Ile Asp Arg Asn Ala Leu Pro Asp Pro Glu Pro Ser Arg Arg Ala His  
                    1410                      1415                      1420

Ala Glu Ala Phe Thr Pro Pro Glu Thr Pro Val Glu Gln Val Leu Ala  
1425                      1430                      1435                      1440

His Ile Trp Gly Glu Val Leu Gly Met Asp Gly Ile Gly Val His Asp  
                    1445                      1450                      1455

His Phe Phe Asp Ser Gly Gly His Ser Leu Leu Val Thr Gln Met Ile  
                    1460                      1465                      1470

Ala Arg Val Arg Asp Met Leu His Val Glu Val Pro Phe Arg Thr Val  
                    1475                      1480                      1485

Phe Asn Ala Pro Thr Val Arg Gly Phe Ala Val Ala Ile Gln Asp Gly  
                    1490                      1495                      1500

Val Asp Pro Gly Trp Ala Arg Arg Ala Ala Asp Leu Leu Ile Ala Val  
1505                      1510                      1515                      1520

Ser Gln Met Ser Asp Val Gln Ile Glu Arg Met Met Ser Ala Ala Gln  
                    1525                      1530                      1535

Asp

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 2766

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 122

Met Gln Asn Ser Ser Pro Asn Thr Ile Asp Leu Ser Leu Ala Arg Arg

| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Gln Leu Leu Asp Arg Leu Leu Gln Glu Asn Ser Pro Glu His Arg Ile | 20  | 25  | 30  |
| Pro Arg Arg Glu Asn Arg Asp Ala Ala Pro Leu Ser Leu Ala Gln Gln | 35  | 40  | 45  |
| Arg Leu Trp Phe Leu His Gln Leu Asp Pro Asp Ser Pro Ala Tyr Asn | 50  | 55  | 60  |
| Ile Pro Ile Ala Leu His Ile Arg Gly Pro Leu Asp Ile Arg Val Leu | 65  | 70  | 75  |
| Leu Arg Ser Leu Glu Ala Val Val Gln Arg His Glu Ser Leu Arg Ser | 85  | 90  | 95  |
| Cys Ile Gly Gly Val Asp Gly Glu Ala Arg Gln Ser Leu Leu Ala Arg | 100 | 105 | 110 |
| Val Thr Leu Glu Leu Pro Val Val Gln Ala Asp Gly Ile Ala Glu Ala | 115 | 120 | 125 |
| Arg Gln Met Ala Leu Arg Asp Ala Gln Ile Pro Phe Asp Leu Arg Lys | 130 | 135 | 140 |
| Pro Pro Leu Leu Arg Thr Lys Leu Ile Cys Leu Asp Asp Lys Gln Gln | 145 | 150 | 155 |
| Ile Leu Leu Leu Thr Leu Ser His Ile Ile Ala Asp Ala Trp Ser Val | 165 | 170 | 175 |
| Ile Thr Phe Val Arg Asp Leu Thr Arg Ser Tyr Glu Ala Phe Val Gln | 180 | 185 | 190 |
| Gly Arg Pro Ser Pro Leu Met Glu Leu Pro Ile Gln Tyr Gly Asp Trp | 195 | 200 | 205 |
| Ala Val His Gln Gln Thr Ser Leu Asn Gln Thr Ala Gln Gln Tyr Trp | 210 | 215 | 220 |
| Lys Lys Gln Leu Ser Gly Thr Leu Pro Phe Leu Asp Leu Pro Thr Asp | 225 | 230 | 235 |
| Arg Pro Arg Pro Ala Gln Gln Thr Trp Arg Gly Ala Val Glu Thr Thr | 245 | 250 | 255 |
| Ala Leu Gly Arg Asp Leu Thr Asp Gly Leu His Ala Phe Ala Leu Arg | 260 | 265 | 270 |

Glu Gly Ala Thr Val Phe Met Thr Ala Ile Ala Ala Phe Gln Val Leu  
275 280 285

Leu His Arg Tyr Thr Ala Gln Glu Asp Ile Leu Ile Gly Val Pro Val  
290 295 300

Ala Gly Arg Thr Gln Arg Glu Thr Glu Gly Leu Val Gly Cys Phe Ala  
305 310 315 320

Asn Met Ile Val Leu Arg Gly Asp Leu Arg Asp Asp Pro Ser Phe Arg  
325 330 335

Ser Leu Leu Ala Arg Thr Arg Asp Thr Ala Leu Ser Ala Leu Ser His  
340 345 350

Gln Asp Phe Pro Phe Glu Arg Leu Val Glu Glu Leu His Pro Pro Arg  
355 360 365

Asp Leu Ser Arg Ser Pro Val Phe Gln Val Ser Phe Ala Leu Leu Pro  
370 375 380

Asp Ala Pro Ala Ile Thr Val Met Pro Gly Leu Thr Ile Ser Arg Glu  
385 390 395 400

Tyr Met His Asn Gly Gly Ser Lys Leu Asp Leu Gly Val Thr Leu Glu  
405 410 415

Pro Ser Gly Asp Gly Leu Met Ala Ser Ala Glu Tyr Asn Thr Asp Leu  
420 425 430

Phe Asp Ala Ala Thr Ile Ala Ser Leu Leu Asp Ala Tyr Arg Thr Leu  
435 440 445

Leu Ala Ser Val Val Thr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ser Thr Ala Ala  
450 455 460

Leu Leu Ser Pro Ala Val Arg Ser Arg Met Leu Glu Gln His Asn Ala  
465 470 475 480

Thr Arg Arg Asp Ala Gly Pro Asn Gly Cys Ala His Glu Leu Val Glu  
485 490 495

Ala Gln Ala Glu Arg Thr Pro His Ala Val Ala Val Val Phe Glu Asp  
500 505 510

His Gln Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Arg Ala Asn Arg Leu Ala  
515 520 525

His Arg Leu Ser Ala Ser Gly Ala Gly Pro Gly Lys Ile Ile Ala Leu  
530 535 540

Ala Met Glu Arg Ser Leu Glu Met Val Ile Ala Leu Leu Ala Ile Leu  
545 550 555 560

Lys Ser Gly Ser Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Pro Ala His Pro Lys Asp  
565 570 575

Arg Leu Ala Arg Ile Leu Asp Glu Val Gln Pro His Ala Val Leu Thr  
580 585 590

Gln Glu Ala Val Ala Glu Met Met Ala Met Met Ala Met Met Ala Val  
595 600 605

Ala Val Glu Pro Glu Ala Ala Asn Leu Val Ser Gly Ser Lys Pro Asp  
610 615 620

Asp Leu Ala Tyr Ile Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Gly Arg Pro Lys  
625 630 635 640

Gly Val Glu Ile Arg His Ser Ser Leu Val Asn Leu Leu Arg Ser Met  
645 650 655

Gln Arg Glu Pro Gly Leu Thr Ala Ala Asp Gly Leu Val Ala Val Thr  
660 665 670

Thr Val Ser Phe Asp Ile Ala Gly Leu Glu Ile Trp Leu Pro Leu Ile  
675 680 685

Thr Gly Ala Arg Val Ile Val Ala Thr Arg Glu Ile Val Val Asp Gly  
690 695 700

Glu Arg Leu Thr Thr Leu Leu Asp Lys Ser Gly Ala Thr Val Met Gln  
705 710 715 720

Ala Thr Pro Ser Gly Trp Arg Gln Leu Leu Asp Ser Gly Trp Lys Pro  
725 730 735

Gly Lys Gly Phe Arg Val Phe Cys Gly Gly Glu Ala Leu Pro Pro Glu  
740 745 750

Leu Ala Arg Arg Ile Leu Asp Ser Gly Val Glu Leu Trp Asn Leu Tyr  
755 760 765

Gly Pro Thr Glu Thr Thr Ile Trp Ser Ala Val His Lys Thr Gln Arg  
770 775 780

Leu Gly Ala Ser Asp Ser Ile Val Pro Ile Gly His Pro Ile Asp Asn  
785 790 795 800

Thr Gln Leu Tyr Ile Leu Asp Ser Arg Met Glu Pro Val Pro Pro Gly

| 805  |      |      |     |      | 810  |      |      |     |      | 815  |      |      |      |      |     |
|------|------|------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| Val  | Pro  | Gly  | Glu | Leu  | Tyr  | Ile  | Gly  | Gly | Ala  | Gly  | Leu  | Ala  | Arg  | Gly  | Tyr |
|      |      |      | 820 |      |      |      |      | 825 |      |      |      |      | 830  |      |     |
| His  | Arg  | Asn  | Pro | Glu  | Leu  | Thr  | Arg  | Glu | Lys  | Phe  | Arg  | Glu  | Trp  | Arg  | Asp |
|      |      | 835  |     |      |      |      | 840  |     |      |      |      | 845  |      |      |     |
| Arg  | Gly  | Arg  | Ile | Tyr  | Ser  | Thr  | Gly  | Asp | Leu  | Ala  | Arg  | Tyr  | Arg  | Ser  | Asp |
|      | 850  |      |     |      |      | 855  |      |     |      |      | 860  |      |      |      |     |
| Gly  | Ala  | Val  | Glu | Cys  | Leu  | Gly  | Arg  | Val | Asp  | Arg  | Gln  | Ile  | Lys  | Leu  | Arg |
| 865  |      |      |     | 870  |      |      |      |     | 875  |      |      |      |      |      | 880 |
| Gly  | Phe  | Arg  | Ile | Glu  | Pro  | Ala  | Glu  | Ile | Glu  | Ala  | Ala  | Ile  | Glu  | Thr  | His |
|      |      |      | 885 |      |      |      |      | 890 |      |      |      |      |      | 895  |     |
| Ile  | Ala  | Val  | Lys | Gln  | Ala  | Ile  | Thr  | Val | Val  | Lys  | Asp  | Asp  | Arg  | Leu  | Ile |
|      |      | 900  |     |      |      |      |      | 905 |      |      |      |      | 910  |      |     |
| Ala  | Tyr  | Leu  | Val | Pro  | Ala  | Thr  | Gly  | Asp | Val  | Arg  | Asp  | Leu  | Gln  | Ser  | Asp |
|      | 915  |      |     |      |      |      | 920  |     |      |      |      | 925  |      |      |     |
| Leu  | Arg  | Ser  | Trp | Leu  | Ala  | Thr  | Arg  | Leu | Pro  | Asp  | Tyr  | Met  | Ile  | Pro  | Ser |
|      | 930  |      |     |      |      | 935  |      |     |      |      | 940  |      |      |      |     |
| Ala  | Phe  | Val  | Ser | Leu  | Ser  | Ser  | Leu  | Pro | Leu  | Thr  | Pro  | Asn  | Gly  | Lys  | Ile |
| 945  |      |      |     | 950  |      |      |      |     | 955  |      |      |      |      |      | 960 |
| Asp  | Ala  | Asn  | Ala | Leu  | Pro  | Gly  | Leu  | Pro | Thr  | Thr  | Pro  | Val  | Ala  | Ala  | Arg |
|      |      | 965  |     |      |      |      |      | 970 |      |      |      |      |      | 975  |     |
| Glu  | Pro  | Met  | Arg | Gly  | Asp  | Val  | Val  | Glu | Thr  | Ile  | Ala  | Ser  | Ile  | Trp  | Arg |
|      |      | 980  |     |      |      |      |      | 985 |      |      |      |      | 990  |      |     |
| Glu  | Val  | Leu  | Arg | Val  | Glu  | His  | Val  | Asp | Tyr  | Arg  | Gln  | Asn  | Phe  | Phe  | Asp |
|      | 995  |      |     |      |      | 1000 |      |     |      |      | 1005 |      |      |      |     |
| Val  | Gly  | Gly  | His | Ser  | Leu  | Met  | Leu  | Thr | Arg  | Val  | Arg  | Gly  | Leu  | Leu  | Glu |
| 1010 |      |      |     |      | 1015 |      |      |     |      | 1020 |      |      |      |      |     |
| Glu  | Arg  | Leu  | Gly | Leu  | Thr  | Leu  | Ser  | Val | Val  | Asp  | Leu  | Phe  | Arg  | His  | Thr |
| 1025 |      |      |     | 1030 |      |      |      |     | 1035 |      |      |      |      | 1040 |     |
| Thr  | Ile  | Glu  | Ser | Leu  | Ala  | Gly  | Leu  | Ala | Glu  | Lys  | Ser  | Glu  | Pro  | Ala  | Ala |
|      |      | 1045 |     |      |      |      | 1050 |     |      |      |      |      | 1055 |      |     |
| Ala  | Glu  | Pro  | Ala | Ala  | Ala  | Val  | Ala  | Glu | Asp  | Arg  | Ile  | Ala  | Val  | Ile  | Gly |
|      | 1060 |      |     |      |      | 1065 |      |     |      |      |      | 1070 |      |      |     |

Met Ala Gly Arg Phe Pro Gly Ala Arg Asn Val Glu Glu Phe Trp Arg  
1075 1080 1085

Asn Leu Arg Asp Gly Val Asp Ser Ile Ala Arg Leu Ser Pro Glu Asp  
1090 1095 1100

Leu Leu Ala Gly Gly Ile Ser Pro Glu Val Phe Gln Asp Pro Ser Tyr  
1105 1110 1115 1120

Val Pro Ala Lys Gly Leu Leu Asp Gly Ile Glu Phe Phe Asp Ala Ala  
1125 1130 1135

Phe Phe Gly Tyr Ser Pro Arg Glu Ala Glu Ile Met Asp Pro Gln His  
1140 1145 1150

Arg Val Phe Leu Glu Cys Ala Trp Glu Ala Met Glu Asn Ala Gly Tyr  
1155 1160 1165

Ala Ala Arg Ser Tyr Lys Gly Ser Ile Gly Val Phe Ala Gly Cys Gly  
1170 1175 1180

Val Asn Thr Tyr Leu Leu Asn Asn Leu Ala Thr Ala Glu Pro Phe Asp  
1185 1190 1195 1200

Phe Ser Arg Pro Ser Ala Tyr Gln Leu Leu Thr Ala Asn Asp Lys Asp  
1205 1210 1215

Phe Leu Ala Thr Arg Val Ser Tyr Lys Leu Asn Leu Arg Gly Pro Ser  
1220 1225 1230

Leu Thr Val Gln Thr Ala Cys Ser Thr Ser Leu Val Ser Val Val Met  
1235 1240 1245

Ala Cys Glu Ser Leu Gln Arg Gly Ala Ser Asp Ile Ala Leu Ala Gly  
1250 1255 1260

Gly Val Ala Ile Asn Val Pro Gln Ser Val Gly Tyr Leu His Gln Pro  
1265 1270 1275 1280

Gly Met Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg Cys Arg Ala Phe Asp Glu Ser  
1285 1290 1295

Ala Gln Gly Thr Val Pro Gly Asn Gly Ala Gly Val Val Val Leu Lys  
1300 1305 1310

Arg Leu Ser Arg Ala Leu Ala Asp Gly Asp Thr Ile Tyr Ala Val Ile  
1315 1320 1325

Arg Gly Ala Ala Ile Asn Asn Asp Gly Ala Glu Arg Met Gly Phe Thr  
1330 1335 1340

Ala Pro Gly Val Asp Gly Gln Thr Arg Leu Ile Arg Arg Thr Gln Glu  
1345 1350 1355 1360

Met Ala Gly Val Lys Pro Glu Ser Ile Gly Tyr Ile Glu Ala His Gly  
1365 1370 1375

Thr Ala Thr Pro Leu Gly Asp Pro Val Glu Ile Ala Ala Ile Ala Ala  
1380 1385 1390

Asn Phe Pro Lys Asn Gly Ser Gly Asp Val Tyr Ile Gly Ser Val Lys  
1395 1400 1405

Thr Asn Ile Gly His Leu Asp Val Ala Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile  
1410 1415 1420

Lys Thr Val Leu Ala Val His Arg Gly Gln Ile Pro Pro Ser Leu Asn  
1425 1430 1435 1440

Phe Gln Arg Pro Asn Pro Arg Ile Asp Phe Ala Asn Thr Pro Phe Arg  
1445 1450 1455

Val Ser Thr Arg Leu Leu Asp Trp Pro Ala Gly Lys Thr Pro Arg Arg  
1460 1465 1470

Ala Ala Val Ser Ser Phe Gly Ile Gly Gly Thr Asn Ala His Val Ile  
1475 1480 1485

Leu Glu Gln Ala Pro Pro Val Thr Pro Ala Ala Ala Ala Pro Glu Arg  
1490 1495 1500

Ser Ala His Val Leu Cys Leu Ser Ala Asn Thr Asp Ala Ala Leu Glu  
1505 1510 1515 1520

Glu Leu Val Arg Ser Tyr Arg Gly His Met Asp Asn Gln Pro Gly Leu  
1525 1530 1535

Ser Phe Gly Asp Val Ala Phe Thr Ala Asn Ala Gly Arg Val His Phe  
1540 1545 1550

Pro His Arg Ile Cys Ile Val Ala Arg Ser Ser Asp Glu Ala Arg Gln  
1555 1560 1565

Arg Leu Thr Glu Ala Arg Arg Val Arg Ile Ala Gln Thr Arg Pro Lys  
1570 1575 1580

Ile Ala Phe Leu Phe Thr Gly Gln Gly Ala Gln Tyr Ala Gly Met Gly  
1585 1590 1595 1600

Arg Gln Phe Tyr Glu Ser Gln Pro Val Phe Arg Ala Ala Met Asp Glu



| 1605                                                            | 1610 | 1615      |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----------|
| Cys Ala Ala Leu Leu Asn Gly Arg Leu Asp Leu Pro Ala Leu Leu Ala |      |           |
| 1620                                                            | 1625 | 1630      |
| Asp Asp Ala Leu Leu Asp Ala Thr Ala Gly Ala Gln Pro Ala Leu Phe |      |           |
| 1635                                                            | 1640 | 1645      |
| Ala Leu Gln Trp Ala Leu Ala Gln Leu Trp Lys Ser Trp Gly Val Thr |      |           |
| 1650                                                            | 1655 | 1660      |
| Pro Asp Leu Val Met Gly His Ser Val Gly Glu Tyr Ala Ala Ala Cys |      |           |
| 1665                                                            | 1670 | 1675 1680 |
| Ile Ala Gly Ala Val Ser Leu Pro Asp Ala Leu Gly Leu Val Ala Glu |      |           |
| 1685                                                            | 1690 | 1695      |
| Arg Gly Arg Leu Met Gln Asn Leu Pro Glu Gly Ala Met Ala Ala Val |      |           |
| 1700                                                            | 1705 | 1710      |
| Ser Ala Gly Glu Gln Arg Cys Ala Ala Ala Ile Thr Ser Arg Val Ser |      |           |
| 1715                                                            | 1720 | 1725      |
| Ile Ala Ala Ile Asn Gly Pro Ala Glu Val Val Ile Ser Gly Ala Pro |      |           |
| 1730                                                            | 1735 | 1740      |
| Gln Asp Ile Glu Ser Ala Leu Ala Thr Leu Arg Ala Glu Gly Ile Lys |      |           |
| 1745                                                            | 1750 | 1755 1760 |
| Thr Gln Met Leu Ala Val Ala Arg Ala Phe His Ser Ser Ser Met Asp |      |           |
| 1765                                                            | 1770 | 1775      |
| Pro Ile Leu Ala Asp Leu Gln Arg Arg Ala Ala Ala Ile Ala Trp Arg |      |           |
| 1780                                                            | 1785 | 1790      |
| Asn Pro Ser Ile Gly Leu Val Ser Asn Leu Thr Gly Lys Leu Ala Gly |      |           |
| 1795                                                            | 1800 | 1805      |
| Glu Gly Gln Leu Ala Asn Pro Leu Tyr Trp Arg Asp His Ala Arg Asn |      |           |
| 1810                                                            | 1815 | 1820      |
| Pro Val Arg Phe Ala Asp Gly Ile Gln Thr Leu Lys Asp Glu Gly Cys |      |           |
| 1825                                                            | 1830 | 1835 1840 |
| Asp Val Phe Leu Glu Ile Gly Pro Lys Pro Val Leu Leu Gly Met Gly |      |           |
| 1845                                                            | 1850 | 1855      |
| Gln Lys Cys Leu Pro Asp Asp Ala Lys Gln Trp Leu Pro Ser Leu Arg |      |           |
| 1860                                                            | 1865 | 1870      |

Lys Gly Arg Asp Glu Trp Glu Thr Ile Leu Ser Ser Val Ala Thr Leu  
1875 1880 1885

Tyr Gln Gly Gly Phe Asp Ile Asp Trp Gln Glu Phe Asp Arg Pro Tyr  
1890 1895 1900

Ser Arg Arg Arg Val Ala Leu Pro Ala Tyr Pro Phe Glu Arg Arg Arg  
1905 1910 1915 1920

His Trp Ile Glu Arg Ser Ser Arg Pro Glu Pro Val Ala Val Ala Ser  
1925 1930 1935

Gly Leu Val Gly Cys Arg Leu Ser Leu Pro Val Ala Asp Val Ile Phe  
1940 1945 1950

Glu Ser Lys Leu Ser Thr Ala Ser Pro Leu Leu Ser Asp His Arg Tyr  
1955 1960 1965

Tyr Gly Ser Val Val Ala Pro Ala Val Tyr Phe Leu Ala Met Ala Leu  
1970 1975 1980

Glu Ala Ser Ala Glu Val Phe Gly Ala Gly Arg His Thr Leu Glu Asn  
1985 1990 1995 2000

Val Asn Phe Ala His Pro Leu Ile Leu Ser Ala Glu Arg Asp Thr Ala  
2005 2010 2015

Val Gln Leu Val Leu Ser Gln Ser Asp Asp Arg His Ala Ser Phe Arg  
2020 2025 2030

Ile Leu Ser Leu Ser Asp Gly Ser Trp Asn Leu His Ala Ala Gly Asn  
2035 2040 2045

Ile Ala Ala His Ala Gly Val Ala Pro Val Pro Arg Leu Val Asp Glu  
2050 2055 2060

Arg Arg Pro Ala Val Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Leu Leu Arg His  
2065 2070 2075 2080

Leu Glu Ile Glu Leu Gly Pro Ser Tyr Arg Arg Ile Gln Arg Ile His  
2085 2090 2095

Phe Gly Glu Gln Glu Ala Leu Ala Ala Ile Asp Ser Ala Thr Pro Leu  
2100 2105 2110

Asn Pro Arg Cys Glu Leu Ala Glu Ala Gly Leu Gln Leu Leu Ser Ala  
2115 2120 2125

Ala Ala Ser Pro Ala Leu Ala Asp Gly Ala Glu His Pro Ile Phe Ala  
2130 2135 2140

Pro Leu Gly Ile Asp Arg Val Cys Phe Tyr Gly Ser Leu Glu Gly Ala  
2145 2150 2155 2160

Val Trp Gly Ala Ala Gln Ile Leu Arg His Ser Pro Asp Gly Phe Thr  
2165 2170 2175

Gly Glu Ala Gln Leu Leu Asp Ser Glu Gly Cys Val Leu Gly Glu Leu  
2180 2185 2190

Gln Gly Val Ser Phe Arg Arg Val Thr Arg Ala Trp Ala Gln Arg Ser  
2195 2200 2205

Glu Arg Lys Pro Glu Leu Tyr Glu Val Glu Trp Arg Pro Glu Pro Leu  
2210 2215 2220

Arg Gln Pro Ser Arg Thr Leu Gln Pro Gly Ala Trp Leu Ile Leu Ala  
2225 2230 2235 2240

Asp Ser Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Gln  
2245 2250 2255

Gly Glu Met Cys Val Thr Val Pro Pro Ala Gly Glu Tyr Met Ser Leu  
2260 2265 2270

Val Gly Glu Arg Asp Trp Arg Gly Ile Val Asn Leu Tyr Ser Leu Asp  
2275 2280 2285

Asp Tyr Glu Leu Gly Cys Arg Ser Thr Leu Ala Leu Val Lys Ser Leu  
2290 2295 2300

Lys Ser Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Thr Ala Gly Ala Gln Ala Thr  
2305 2310 2315 2320

Ser Ala Val His Asn Pro Met Gln Ala Ala Leu Trp Gly Phe Gly Arg  
2325 2330 2335

Val Ile Ala Arg Glu His Pro Asp Leu Trp Gly Gly Leu Ile Asp Leu  
2340 2345 2350

Asp Pro Asp Asp Ala His Ala Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gln Met  
2355 2360 2365

Arg Asp Phe Asp Gly Glu Asp Gln Ser Ala Trp Arg Ser Asn Arg Arg  
2370 2375 2380

Tyr Val Pro Arg Leu Thr Arg Arg Pro Ser Ala Arg Ala Ala Val Arg  
2385 2390 2395 2400

Leu Val Ser Gly Ala Thr Tyr Leu Ile Thr Gly Gly Leu Gly Ala Leu

|                                                                 |      |           |
|-----------------------------------------------------------------|------|-----------|
| 2405                                                            | 2410 | 2415      |
| Gly Leu Thr Val Ala Lys Trp Met Val Glu His Gly Ala Thr Arg Val |      |           |
| 2420                                                            | 2425 | 2430      |
| Val Leu Ala Gly Arg Arg Pro Pro Asn Glu Glu Gln Gln Arg Val Leu |      |           |
| 2435                                                            | 2440 | 2445      |
| Gln Gln Ile Gly Ala Thr Ala Glu Thr Val Asp Val Ser Arg Glu Glu |      |           |
| 2450                                                            | 2455 | 2460      |
| Glu Val Ala Asp Leu Ile Arg Arg Ile His Thr Glu Thr Ser Pro Leu |      |           |
| 2465                                                            | 2470 | 2475 2480 |
| Arg Gly Val Ile His Ala Ala Gly Val Leu Asp Asp Gly Val Leu Leu |      |           |
| 2485                                                            | 2490 | 2495      |
| Asn Gln Asp Trp Thr Arg Ile Ala Ser Val Met Ala Pro Lys Ala Glu |      |           |
| 2500                                                            | 2505 | 2510      |
| Gly Ala Val His Leu His His His Thr Arg Asp Leu Pro Leu Asp Phe |      |           |
| 2515                                                            | 2520 | 2525      |
| Phe Val Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ser Leu Leu Gly Pro Ala Gly Gln |      |           |
| 2530                                                            | 2535 | 2540      |
| Ala Gly Tyr Ala Ala Ala Asn Ala Val Leu Asp Ala Leu Ala His His |      |           |
| 2545                                                            | 2550 | 2555 2560 |
| Arg Arg Gly Leu Gly Leu Pro Ala Thr Ser Ile Asn Trp Gly Arg Trp |      |           |
| 2565                                                            | 2570 | 2575      |
| Ser Gly Ala Gly Met Ala Ala Arg Thr Ser Gln Ser Met Ala Gly Val |      |           |
| 2580                                                            | 2585 | 2590      |
| Ala Ser Leu Ser Val Asp Glu Gly Leu His Ile Leu Glu Ala Val Leu |      |           |
| 2595                                                            | 2600 | 2605      |
| His Glu Cys Pro Ile Gln Ile Ala Ala Leu Pro Ala Gly Ser Ile Thr |      |           |
| 2610                                                            | 2615 | 2620      |
| Gly Glu Leu Leu Arg Pro Ala Ala Leu Pro Ser Pro Gln Leu Arg Thr |      |           |
| 2625                                                            | 2630 | 2635 2640 |
| Arg Leu Asn Glu Ala Thr Pro Arg Gln Arg Glu Ala Ile Leu Ile Ala |      |           |
| 2645                                                            | 2650 | 2655      |
| His Ile Arg Glu Ser Leu Ala Arg Phe Val Gly Ile Ala Thr Ser Thr |      |           |
| 2660                                                            | 2665 | 2670      |

Pro Leu Asp Pro Gln Gln Pro Leu Gly Glu Leu Gly Leu Asp Ser Leu  
2675 2680 2685

Met Ala Ile Glu Leu Arg Asn Ser Leu Ser Gln Ser Leu Gly Gln Pro  
2690 2695 2700

Leu Pro Ala Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Pro Ser Leu Asp Ala Ile Val  
2705 2710 2715 2720

Ser Tyr Val Leu His Ala Val Phe Pro Pro Glu Ala Ser Pro Val Glu  
2725 2730 2735

Ala Pro Glu Phe Glu Asn Leu Ala Arg Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu  
2740 2745 2750

Asp Ser Arg Leu Ala Gln Val Asp Gln Trp Leu Glu Thr Gln  
2755 2760 2765

<210> 123

<211> 1763

<212> PRT

<213> bacterie

<400> 123

Met Ser Gly Ser Asp Asp Leu Ser Lys Leu Arg Arg Ala Val Ile Ala  
1 5 10 15

Leu Asp Lys Val Gln Lys Arg Ile Asp Gln Leu Glu Ser Ala Arg Ser  
20 25 30

Glu Pro Ile Ala Leu Ile Gly Ala Gly Cys Arg Phe Pro Gly Ala Ser  
35 40 45

Asn Leu Asp Ala Tyr Trp Ser Leu Leu Arg Glu Gly Arg Ser Ala Val  
50 55 60

Arg Glu Val Pro Pro Asp Arg Trp Asp Ile Asp Ala Tyr Tyr Asp Pro  
65 70 75 80

Asp Pro Gly Ala Thr Gly Arg Met Tyr Thr Arg Tyr Gly Gly Phe Ile  
85 90 95

Asp Gln Val Asp Arg Phe Asp Ala Arg Phe Phe Gly Ile Ala Pro Arg  
100 105 110

Glu Ala Ile Ser Leu Asp Pro Gln Gln Arg Leu Leu Leu Glu Val Thr  
115 120 125

Trp Glu Ala Ile Glu Asn Ala Gly Leu Pro Pro Asp Arg Leu Ala Gly  
 130 135 140  
 Ser Arg Thr Gly Val Phe Met Gly Ile Phe Ser Asn Asp Tyr Tyr Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Met Arg Gly Gly Asp Ala His Ile Asp Ala Tyr Thr Gly Thr  
 165 170 175  
 Gly Asn Thr Ala Ser Val Ala Ala Gly Arg Leu Ser Tyr Ile Leu Gly  
 180 185 190  
 Leu Gln Gly Pro Asn Met Ala Ile Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu  
 195 200 205  
 Val Ala Val His Leu Ala Cys Gln Ser Leu Arg Ser Gly Glu Ser Asp  
 210 215 220  
 Leu Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Leu Ile Leu Ser Pro Asp Arg Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Tyr Phe Cys Lys Leu Lys Ala Met Ala Ala Asp Gly Arg Cys Lys  
 245 250 255  
 Ala Phe Asp Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Arg Gly Glu Gly Cys Gly  
 260 265 270  
 Val Val Val Leu Lys Arg Leu Ser Asp Ala Leu Arg Asp Arg Asp Pro  
 275 280 285  
 Val Met Ala Val Ile Arg Gly Thr Ala Ile Asn Gln Asp Gly Arg Ser  
 290 295 300  
 Asn Gly Leu Thr Ala Pro Asn Gly Pro Ala Gln Glu Ala Val Ile Arg  
 305 310 315 320  
 Gln Ala Val Gly Asp Ala Arg Leu Gln Thr Leu Asp Val Ser Tyr Val  
 325 330 335  
 Glu Ala His Gly Thr Gly Thr Pro Leu Gly Asp Pro Ile Glu Ala Gly  
 340 345 350  
 Ala Leu Ala Ala Ala Leu Gly Ala Gly Arg Thr Asn Gly Asn Lys Leu  
 355 360 365  
 Lys Leu Gly Ser Val Lys Thr Asn Phe Gly His Leu Glu Ala Ala Ala  
 370 375 380  
 Gly Val Ala Ala Leu Ile Lys Val Ala Leu Met Leu Gln Asn Glu Ala  
 385 390 395 400

Ile Pro Pro His Leu Asn Leu Thr Thr Pro Ser Pro His Ile Asp Trp  
 405 410 415  
 Asn Thr Leu Pro Leu Glu Ile Pro Ala Arg Leu Thr Pro Trp Pro Val  
 420 425 430  
 Ala Pro Gly Gly Arg Arg Val Ala Gly Ile Asn Ser Phe Gly Leu Ser  
 435 440 445  
 Gly Thr Asn Ala His Val Leu Ile Glu Gln Ala Pro Gln Gln Ala Ala  
 450 455 460  
 Ser Ser Thr Pro Ala Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Ser Ala Arg Ser Pro  
 465 470 475 480  
 Glu Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg Ala Tyr Arg Asp Val Val Asn Asp  
 485 490 495  
 Asn Pro Ala Asp Thr Cys Tyr Thr Ala Cys Ala Arg Arg Thr Ser Tyr  
 500 505 510  
 Glu His Arg Ala Ala Phe Thr Gly Thr Asn Ala Gln Asp Leu Met Ala  
 515 520 525  
 Gly Leu Asp Ser Phe Leu Ala Gly Asn Pro Asn Arg Asp Thr Ala Thr  
 530 535 540  
 Gly Phe Val Pro Arg Gly Gln Lys Arg Lys Val Val Phe Val Leu Pro  
 545 550 555 560  
 Gly Gln Gly Ser Gln Trp Pro Gly Met Gly Arg Asp Leu Met Ala Ser  
 565 570 575  
 Glu Pro Val Phe Arg Ala Ala Ile Glu Glu Cys Gly Arg Ala Met Gln  
 580 585 590  
 Pro Tyr Val Asp Trp Ser Leu Thr Gln Glu Leu Gln Gly Pro Leu Asp  
 595 600 605  
 Arg Ile Asp Val Ile Gln Pro Ala Leu Phe Ala Val Gly Val Ala Leu  
 610 615 620  
 Ala Gly Leu Trp Arg His Trp Gly Ile Glu Pro Asp Ala Val Ile Gly  
 625 630 635 640  
 His Ser Met Gly Glu Val Ala Ala Ala His Ile Ala Gly Ala Leu Thr  
 645 650 655  
 Leu Asp Glu Ala Ala Arg Val Ile Cys Leu Arg Ser Arg Met Leu Ala

| 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Arg | Gly | Gln | Gly | Glu | Met | Ala | Val | Val | Glu | Leu | Ala | Leu | Asp |
|     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |     |
| Glu | Ala | Ile | Ala | Ala | Ile | Ala | Gly | Arg | Ser | Asp | Arg | Val | Ser | Ile | Ala |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Asn | Ser | Pro | Arg | Ser | Thr | Val | Leu | Ser | Gly | Asp | Ser | Ala | Ala |
|     | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |
| Leu | Gly | Glu | Leu | Leu | Arg | Glu | Leu | Glu | Ala | Lys | Asp | Val | Phe | Cys | Arg |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Arg | Val | Lys | Val | Asp | Ile | Ala | Ser | His | Ser | His | Leu | Met | Asp | Ser | Val |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Cys | Ala | Ala | Leu | Pro | Gly | Val | Val | Gly | Ala | Leu | Gln | Pro | Arg | Pro | Ala |
|     | 755 |     |     |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |
| Ala | Leu | Gly | Met | Tyr | Ser | Thr | Val | Thr | Gly | Ala | Ala | Ile | Ser | Gly | Glu |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Glu | Leu | Val | Ser | Ala | Tyr | Trp | Ala | Arg | Asn | Leu | Arg | Gln | Pro | Val | Met |
|     | 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     | 800 |
| Leu | Ser | Thr | Ala | Val | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | His | Asp | Val | Phe |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| Leu | Glu | Leu | Ser | Pro | His | Pro | Leu | Leu | Val | Gln | Pro | Ile | Gln | Glu | Thr |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |
| Leu | Gly | Asp | Arg | Ala | Ala | Ile | Ala | Ala | Ala | Ser | Leu | Arg | Arg | Asp | Glu |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |
| Asp | Gly | Asn | Leu | Ala | Leu | Arg | Arg | Thr | Leu | Gly | Ala | Leu | Leu | Thr | Asn |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |
| Gly | Val | Thr | Pro | Asp | Trp | Ser | Arg | Ile | Tyr | Pro | Asn | Gly | Gly | Gln | Thr |
|     | 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     | 880 |     |
| Arg | Arg | Leu | Pro | Asn | Tyr | Pro | Trp | Gln | Arg | Glu | Arg | Tyr | Trp | Ile | Asp |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     |     | 890 |     |     |     |     | 895 |     |
| Ile | Arg | Pro | Pro | Gln | Val | Glu | Ser | Gln | Ala | Leu | Pro | Gly | Arg | Arg | Ile |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |     |
| Pro | Ser | Pro | Leu | Pro | Glu | Met | Gln | Phe | Glu | Ser | Thr | Val | Glu | Ala | Lys |
|     |     | 915 |     |     |     |     | 920 |     |     |     |     | 925 |     |     |     |



Asp Phe Ala Asp His Arg Leu His Asp Val Ile Val Thr Pro Gly Ala  
930 935 940

Trp His Leu Ala Met Ala Leu Ala Ala Arg Gln Gly Leu Gly Ala  
945 950 955 960

Gly Pro His His Val Glu His Val Ser Leu Thr Gly Ala Leu Thr Leu  
965 970 975

Pro Glu Asn Asp Ala Ala Arg Gln Val Gln Leu Val Leu Arg His Glu  
980 985 990

Glu Gly Gly Gly Ala Ser Phe Arg Ile Tyr Ser Arg Glu Asp Ser Trp  
995 1000 1005

Lys Leu His Ser Glu Gly Met Leu Gln Ala Gly Asp Ser Thr Ala Ser  
1010 1015 1020

Ile Asp Leu Asp Ala Ile Arg Ala Arg Cys Thr Ala Glu Leu Thr Ala  
1025 1030 1035 1040

Asp Ala Phe Tyr Ser Arg Leu Trp Asp Arg Gly Tyr His Phe Gly Pro  
1045 1050 1055

Thr Phe Arg Thr Ile Gly Pro Ile Trp Arg Gly Asn Gly Glu Val Leu  
1060 1065 1070

Cys Arg Val Asp Ile Pro Leu Thr Glu Met Gln Thr Ile Asp Cys Cys  
1075 1080 1085

Leu Gln Leu Pro Ala Ala Leu Val His His Asp Asp Leu Lys Asp Val  
1090 1095 1100

His Val Pro Val Gly Leu Asp Arg Phe Ser Leu Ala Glu Val Pro Thr  
1105 1110 1115 1120

Gly Pro Val Trp Gly Tyr Ala Val Leu Arg Pro Asp Ser Thr Val Asp  
1125 1130 1135

Val Arg Leu Val Thr Gly Thr Gly Ser Val Val Ala Glu Leu Val Gly  
1140 1145 1150

Leu Gln Ser Arg Val Ala His Ser Gly Gln Leu Gly Glu Ser Glu Ile  
1155 1160 1165

Pro Thr Trp Thr Val Gln Trp Thr Ala Ser Val Arg Arg Gly Asp Ala  
1170 1175 1180

Asn Ala Gly Asn Ala Gly Gly Pro Trp Leu Val Ile Gly Glu Pro Ala  
1185 1190 1195 1200

Ile Ala Glu Thr Leu Gln Lys Arg Gly Gln Thr Cys Arg Thr Ala Asp  
1205 1210 1215

Thr Cys Ser Gly Pro Pro Cys Arg Gln Ile Val Tyr Cys Pro Ser Pro  
1220 1225 1230

Arg Ile Asp Asp Leu Leu Ser Val Leu Arg Ser Ile Val Gln Ala Gly  
1235 1240 1245

Trp Pro Glu Pro Pro Arg Leu Trp Leu Leu Thr Arg Gly Ser Ala Ala  
1250 1255 1260

Val Leu Asn Ser Asp Lys Asp Ile Asp Ile Arg Gln Ala Trp Leu His  
1265 1270 1275 1280

Gly Ile Gly Arg Thr Ile Ala Tyr Glu His Pro Glu Leu Arg Cys Thr  
1285 1290 1295

Leu Val Asp Leu Asp Ala His Ser Asn Asp Cys Gly His Leu Ala Thr  
1300 1305 1310

Leu Met Leu Ser Asn Ile Ala Glu Asp Gln Val Ala Ile Arg Gln Gly  
1315 1320 1325

Thr Val Trp Ala Pro Arg Leu Ser Leu His Lys Ile Pro Ser Ala Pro  
1330 1335 1340

Asp Val Ala Phe Arg Ala Asp Ala Thr Tyr Leu Ile Thr Gly Gly Leu  
1345 1350 1355 1360

Gly Gly Leu Gly Leu Gln Val Ala Gly Trp Leu Ala Ala Ala Gly Ala  
1365 1370 1375

Arg His Leu Val Leu Leu Gly Arg Ser Glu Arg Pro Arg Pro Gln Leu  
1380 1385 1390

Glu Gly Val Asn Val Lys Ile Ile His Ala Asp Val Ala Asp Arg Gln  
1395 1400 1405

Gln Leu Ser Asp Ala Leu Ala Ile Ile Asp Arg Asp Met Pro Pro Leu  
1410 1415 1420

Arg Gly Val Phe His Leu Ala Gly Thr Leu Ala Asp Gly Met Leu Leu  
1425 1430 1435 1440

Asn Leu Thr Thr Glu Arg Phe Glu Ala Ala Met Ala Pro Lys Val Ala  
1445 1450 1455

Gly Ala Trp Asn Leu His Glu Leu Thr Ala Gly Arg Pro Leu Asp His

| 1460                                                                                   | 1465 | 1470 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Phe Val Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ala Thr Val Gly Ser Pro Gly Gln<br>1475 1480 1485      |      |      |
| Gly Asn Tyr Ala Ala Gly Asn Ser Phe Leu Asp Ala Leu Ala His Leu<br>1490 1495 1500      |      |      |
| Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Val Ser Ile Ala Trp Gly Pro Trp<br>1505 1510 1515 1520 |      |      |
| Thr Gln Val Gly Leu Ala Ala Gln Ala Asn Arg Gly Asp Arg Leu Ala<br>1525 1530 1535      |      |      |
| Ala Arg Gly Ile Ser Val Ile Gln Pro Gln Gln Gly Leu Arg Ala Leu<br>1540 1545 1550      |      |      |
| Tyr Lys Ala Leu Thr Gln Ile Arg Pro His Val Ala Val Met Asn Phe<br>1555 1560 1565      |      |      |
| Asp Ile Ala Gln Trp Leu Arg Tyr Tyr Pro Ser Ala Ala Ser Met Ser<br>1570 1575 1580      |      |      |
| Leu Leu Ala Gly Ile Ala Pro Ala Ala Ala Asp Thr Lys Pro Ala Ala<br>1585 1590 1595 1600 |      |      |
| Asp Met Arg Ser Glu Leu Leu Ala Val Pro Ala Gly Arg Gln Arg Arg<br>1605 1610 1615      |      |      |
| Ala Arg Leu Glu Thr Leu Leu Met His Glu Ala Gly His Val Leu Arg<br>1620 1625 1630      |      |      |
| Phe Asp Pro Ala Lys Leu Asp Gly Arg Ala Thr Leu Gly Asp Leu Gly<br>1635 1640 1645      |      |      |
| Phe Asp Ser Leu Met Ala Leu Glu Phe Arg Asn Arg Leu Glu Ala Gly<br>1650 1655 1660      |      |      |
| Leu Arg Val Lys Leu Ser Ala Thr Leu Ile Trp Arg Tyr Pro Thr Phe<br>1665 1670 1675 1680 |      |      |
| Ser Ala Leu Ala Gln His Leu Ala Asp Lys Leu Gly Leu Pro Leu Glu<br>1685 1690 1695      |      |      |
| Ser Met Ala Gly Asn Ala Glu Pro Ser Thr Val Ala Ala Val Ala Thr<br>1700 1705 1710      |      |      |
| Leu Ala Thr Val Gly Thr Ala Ala Gly Glu Asp Arg Ser Pro Ala Ala<br>1715 1720 1725      |      |      |

Ala Asp Asp Leu Asp Ala Val Ala Asn Gln Ile Ala Gly Leu Gly Asp  
 1730 1735 1740

Lys Glu Ile Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Phe Ala His Phe Ser Gly  
 1745 1750 1755 1760

Ala Ser Glu

<210> 124

<211> 2153

<212> PRT

<213> bacterie.

<400> 124

Met Ser Ser Ile Ser Glu Arg Phe Pro Asn Leu Thr Pro Leu Gln Gln  
 1 5 10 15

Ala Tyr Leu Thr Leu Glu His Met Gln Arg Arg Leu Asp Ala Ala Glu  
 20 25 30

Arg Asp Ala Arg Glu Pro Ile Ala Ile Val Gly Leu Gly Cys Arg Phe  
 35 40 45

Pro Gly Gly Asp Gly Pro Asp Glu Phe Trp Gln Met Leu Arg Ser Gly  
 50 55 60

Val Asp Ala Ile Arg Glu Val Pro Pro Gly Arg Trp Asp Glu Glu Ser  
 65 70 75 80

Val Arg Arg Ile Leu Lys Ser Leu Asn Pro Ala Thr Pro Val Lys Ile  
 85 90 95

Gln Ala Gly Phe Leu Asp Ser Ile Asp Gly Phe Asp Asn Asp Phe Phe  
 100 105 110

Gly Ile Ser Pro Arg Glu Ala Val Ser Ile Asp Pro Gln Gln Arg Leu  
 115 120 125

Leu Leu Glu Val Ala Trp Glu Ala Leu Glu Asp Ala Gly Gln Thr Met  
 130 135 140

Glu Gly Leu Ser Gly Ser Arg Thr Gly Val Phe Val Gly Ile His Ser  
 145 150 155 160

Gln Ser Ser Asp Tyr Phe Trp Met Gln Thr Ala Asp Gly Ala Arg Ile  
 165 170 175

Asp Pro Tyr Thr Ala Thr Gly Thr Ala His Ser Val Ile Ala Gly Arg  
180 185 190

Leu Ser Tyr Leu Leu Asn Leu Gln Gly Pro Ser Ile Ala Leu Asp Thr  
195 200 205

Ala Cys Ser Ser Ser Leu Ala Ala Val His Leu Ala Cys Gln Ser Leu  
210 215 220

Arg Ser Gly Glu Cys Thr Leu Ala Val Ala Gly Gly Val Asn Leu Arg  
225 230 235 240

Phe Ser Pro Glu Phe Met Tyr Ala Thr Ser Lys Met Gly Thr Ala Ser  
245 250 255

Pro Ser Gly Arg Cys Arg Ala Phe Asp Ala Ala Ala Asp Gly Ile Val  
260 265 270

Phe Gly Glu Gly Cys Gly Val Val Val Leu Lys Arg Leu Ser Asp Ala  
275 280 285

Leu Ala Ala Gly Asp Arg Val Trp Ala Val Val Arg Gly Ser Ala Val  
290 295 300

Asn Gln Asp Gly Arg Ser Ala Gly Leu Thr Ala Pro Asn Val Val Ser  
305 310 315 320

Gln Gln Val Val Ile Arg Ser Ala Leu Ala Asn Ala Gly Val Ala Ala  
325 330 335

Gln Gln Ile Gly Tyr Ile Glu Ala His Gly Thr Gly Thr Pro Leu Gly  
340 345 350

Asp Pro Ile Glu Ile Glu Ala Leu Ala Glu Thr Val Gly Leu Pro Arg  
355 360 365

Pro Val Gly Asp Val Cys Ala Val Gly Ser Leu Lys Ser Asn Ile Gly  
370 375 380

His Leu Glu Gly Ala Ala Gly Ile Ala Gly Leu Ile Lys Ala Val Leu  
385 390 395 400

Ala Leu Ser His Glu Thr Ile Pro Pro Ser Leu His Val Arg Gln Leu  
405 410 415

Asn Pro Asn Ile Arg Leu Glu Gly Thr Ser Leu Asp Ile Val Lys Glu  
420 425 430

Val Arg Pro Trp Pro Ala Gly Ser Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Ser  
435 440 445

Ala Phe Gly Trp Ser Gly Thr Asn Ala His Val Val Leu Glu Glu Ala  
450 455 460

Ala Pro Thr Gly Arg Gly Glu Ala Ala Ser Gly Phe His Ser Arg Pro  
465 470 475 480

Pro Ala Ala Ala Ala Arg Ala Ala Val Pro Leu Ala Glu Gly Asp Thr  
485 490 495

Gly Gly Thr Pro Asp Ile Ala Gly Thr Pro Asp Thr Ala Asp Thr Pro  
500 505 510

Asp Thr Ala Asp Thr Pro Asp Ile Ala Gly Thr Ala Gly Thr Ala Ala  
515 520 525

Thr Thr Gly Ile Ala Asp Ala Met Tyr Val Leu Pro Leu Ser Ala His  
530 535 540

Gly Ala Asp Glu Leu Arg Arg Val Ala Arg Ala Tyr Gly Glu Leu Leu  
545 550 555 560

Thr Ala Ser His Ala Pro Ser Leu Arg Asp Leu Cys Tyr Thr Ala Ala  
565 570 575

Val Arg Arg Thr His His Arg Cys Arg Leu Ala Val Ser Gly Arg Thr  
580 585 590

Ala Glu Glu Leu Ala Ala Gln Leu Gln Gly Ile Thr Ile Pro Ser Gln  
595 600 605

Arg Arg Lys Thr Val Phe Val Phe Ser Gly Gln Gly Ser Gln Trp Ile  
610 615 620

Gly Met Gly Arg Ser Trp Met Asp Arg Glu Pro Val Ile Arg Glu Ala  
625 630 635 640

Leu Glu Arg Cys Glu Ala Ala Met Arg Pro Tyr Val Asp Trp Ser Leu  
645 650 655

Lys Glu Glu Leu Ala Lys Leu Asp Arg Val Glu Val Ile Gln Pro Ala  
660 665 670

Leu Phe Ala Leu Gln Val Ala Ile Ala Ala Leu Trp Arg Ser Trp Gly  
675 680 685

Ile Glu Pro Asp Ala Val Ile Gly His Ser Met Gly Glu Val Ala Ala  
690 695 700

Ala His Val Ala Gly Ala Leu Thr Leu Gln Asp Ala Ala Arg Ile Ile

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 705 |     | 710 |     | 715 |     | 720 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys | Ser | Arg | Ser | Arg | Leu | Leu | Ser | Arg | Ile | Ser | Gly | Leu | Gly | Gly | Met |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Ala | Met | Val | Glu | Leu | Pro | Leu | Ala | Glu | Cys | Glu | Ala | Val | Leu | Ser | Thr |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Tyr | Thr | Glu | Arg | Leu | Ser | Pro | Ala | Val | Ser | Asn | Gly | Pro | Asn | Ser | Thr |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |
| Val | Ile | Ser | Gly | Glu | Val | Glu | Ala | Leu | Ala | Glu | Val | Val | Ala | Thr | Leu |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |
| Glu | Arg | Arg | Gly | Val | Ser | Cys | Arg | Pro | Val | Lys | Val | Asp | Phe | Ala | Ala |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |
| His | Ser | Pro | Gln | Val | Asp | Pro | Leu | Cys | Asp | Glu | Leu | Leu | Gln | Ser | Leu |
|     |     |     | 805 |     |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| Asp | Gly | Ile | Gln | Pro | Arg | Pro | Ala | Thr | Ile | Pro | Phe | Tyr | Ser | Thr | Val |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |
| Thr | Gly | Ala | Thr | Leu | Glu | Thr | Thr | Ser | Leu | Asp | Ser | Thr | Tyr | Trp | Ala |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |
| Arg | Asn | Leu | Arg | Ser | Pro | Val | Leu | Phe | Trp | Gln | Gly | Ile | Arg | His | Leu |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |
| Ala | Asp | Ser | Gly | His | Asp | Val | Phe | Leu | Glu | Ile | Ser | Pro | His | Pro | Ile |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |     | 880 |
| Leu | Leu | Pro | Ala | Ile | Gly | Gly | Asn | Ala | Ala | Leu | Val | Pro | Ser | Leu | Arg |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     | 890 |     |     |     |     |     | 895 |     |
| Arg | Asp | Gln | Asp | Glu | Arg | Gly | Ser | Met | Leu | Thr | Ser | Leu | Gly | Ala | Leu |
|     |     | 900 |     |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |     |
| Tyr | Glu | Ala | Gly | His | Thr | Val | Ala | Trp | Arg | Thr | Val | Tyr | Pro | Ser | Gly |
|     |     | 915 |     |     |     |     | 920 |     |     |     |     | 925 |     |     |     |
| Asn | Cys | Val | Arg | Leu | Pro | Arg | Tyr | Pro | Trp | Gln | Arg | Arg | Arg | Phe | Trp |
|     | 930 |     |     |     |     | 935 |     |     |     |     | 940 |     |     |     |     |
| Leu | Asp | Ala | Ser | Pro | Ala | Arg | His | Ala | Ile | Thr | Leu | Gly | Asn | Pro | Leu |
| 945 |     |     |     |     | 950 |     |     |     |     | 955 |     |     |     |     | 960 |
| Leu | Gly | Lys | Arg | Val | Glu | Ala | Ser | Thr | Gln | Pro | Gly | Thr | Phe | Phe | Trp |
|     |     |     |     | 965 |     |     |     |     | 970 |     |     |     |     | 975 |     |

Glu Thr Glu Leu Ser Leu Ala Ser Val Pro Trp Leu Ala Asp His Arg  
980 985 990

Val Gln Gly Glu Val Val Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Leu Asp Met Ala  
995 1000 1005

Leu Ala Gly Thr Ser Glu Thr Phe Gly Glu Ser Pro Cys Val Leu Glu  
1010 1015 1020

His Val Thr Phe Thr Gln Met Leu Ile Val Pro Arg Asp Gly Ser Met  
1025 1030 1035 1040

Thr Leu Gln Leu Ala Ile Ala Val Asp Arg Pro Gly Met Ala Ser Phe  
1045 1050 1055

Arg Ile Ser Ser Arg Gln Ala Ser Thr Trp Val Leu His Ala Ser Gly  
1060 1065 1070

Asp Ile Arg Gln Thr Pro Ala Asp Ala Ser Thr Val Pro Pro Asp Ser  
1075 1080 1085

Ala Glu Thr Val Gln Ala Arg Cys Pro Thr Val Val Pro Ala Ala Glu  
1090 1095 1100

Leu Trp Arg Gln Met Ala Glu His Gly Val Glu Tyr Gly Pro Ala Phe  
1105 1110 1115 1120

Arg Ala Leu Glu Gln Ile Trp Ser Cys Pro Gly Glu Ala Ile Gly Arg  
1125 1130 1135

Leu Arg Ser Ser Glu Thr Arg Ser Thr Ala Pro Ala Phe Leu Asp Ala  
1140 1145 1150

Cys Leu Gln Ile Ile Ala Ala Ala Phe Gly Pro Ala Gly Gly Thr Trp  
1155 1160 1165

Leu Pro Ala Gly Ile Asp Arg Met Arg Trp Leu His Pro Ala Arg Ser  
1170 1175 1180

Val Val Trp Thr His Ala Arg Leu Glu Gly Pro Ile Ala Asp Leu Ser  
1185 1190 1195 1200

Leu Leu Asp Gly Glu Gly Gln Leu Val Ala Arg Ile Glu Gly Leu Arg  
1205 1210 1215

Leu Gln Arg Leu Asp Ala Ser Glu Arg Ile Asp Met Arg Gly Trp Leu  
1220 1225 1230

His Glu Leu Arg Trp Val Ala Gln Pro His Ala Ala Ala Glu Pro Pro  
1235 1240 1245



Ala Ala Arg Ala Ala Arg Ser Trp Leu Ile Val Gly Ala Val Asp Ser  
1250 1255 1260

Ala Leu Thr Ala Trp Leu Arg Ala Thr Gly Asn Arg Val Thr Gln Thr  
1265 1270 1275 1280

Ser Pro Glu Lys Leu Asp Glu Leu Gln Pro Pro Leu Glu Glu Ile Val  
1285 1290 1295

Phe Leu Leu Glu His Glu Pro Ser Cys Asp Arg Ile Leu His Leu Leu  
1300 1305 1310

Gln Thr Leu Gly Arg Thr Pro Trp Arg Gln Ala Pro Arg Leu Trp Leu  
1315 1320 1325

Val Thr Arg Gly Ala Gln Pro Val Asp Gly Gln Ile Leu Gln Ala Gly  
1330 1335 1340

Ile Ala Gln Ala Pro Phe Trp Gly Leu Gly Arg Thr Val His Tyr Glu  
1345 1350 1355 1360

His Pro Glu Leu Asn Cys Thr Leu Ile Asp Leu Asp Pro Ala Gly Gly  
1365 1370 1375

Glu Glu Glu Leu Leu His Glu Leu Leu Thr Asn Asn Gly Glu Asn Gln  
1380 1385 1390

Ile Ala Phe Arg Gly Gly Ala Arg Tyr Val Ala Arg Val Ala Arg His  
1395 1400 1405

Glu Ala Asp Met Gln Pro Ala Met Phe Lys Ala Gly Asp Arg Pro Phe  
1410 1415 1420

Arg Leu Glu Ile Asp Ala Pro Gly Val Leu Asp Arg Leu Arg Leu Arg  
1425 1430 1435 1440

Ala Thr Ser Arg Arg Pro Pro Gln Ala Gly Glu Val Glu Ile Glu Val  
1445 1450 1455

Cys Ala Ala Gly Leu Asn Phe Leu Asp Val Leu Leu Ala Leu Gly Val  
1460 1465 1470

Met Pro Asp Asp Ala Pro Gly Ala Ile Ala Gly Ser Pro Arg Leu Gly  
1475 1480 1485

Gly Glu Cys Ser Gly Arg Ile Val Ala Met Gly Lys Gly Val Thr Asp  
1490 1495 1500

Phe Arg Ile Gly Asp Glu Val Val Ala Leu Ala Pro Cys Ser Phe Gly

|                                                                 |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|
| 1505                                                            | 1510 | 1515 | 1520 |
| Arg Phe Val Thr Thr Pro Ala Phe Arg Val Ala Leu Lys Pro Ala Asn | 1525 | 1530 | 1535 |
| Ile Pro Ala Glu Gln Ala Ala Ala Leu Pro Ile Ala Phe Leu Thr Ala | 1540 | 1545 | 1550 |
| Asp Tyr Ala Leu Ser Arg Ala Ala Arg Leu Ala Pro Gly Glu Arg Val | 1555 | 1560 | 1565 |
| Leu Ile His Ala Ala Thr Gly Gly Val Gly Leu Ala Ala Ile Gln Ile | 1570 | 1575 | 1580 |
| Ala Gln Arg Ala Gly Ala Glu Ile Phe Ala Thr Ala Gly Ser Pro Glu | 1585 | 1590 | 1595 |
| Lys Arg Ala Tyr Leu Arg Ser Leu Gly Ile Ala His Val Ser Asp Ser | 1605 | 1610 | 1615 |
| Arg Ser Met Ala Phe Val Asp Asp Ile Arg Asn Trp Thr Asn Gln Glu | 1620 | 1625 | 1630 |
| Gly Val Asp Val Val Leu Asn Ser Leu Ser Gly Asp Leu Leu Glu Ala | 1635 | 1640 | 1645 |
| Ser Phe Asp Leu Leu Arg Asp His Gly Arg Phe Ile Glu Ile Gly Lys | 1650 | 1655 | 1660 |
| Arg Asp Tyr Tyr Ala Gly Arg Lys Leu Gly Leu Arg Pro Phe Leu Lys | 1665 | 1670 | 1675 |
| Asn Leu Ser Tyr Thr Leu Val Asp Leu Leu Gly Met Ser Leu Lys Arg | 1685 | 1690 | 1695 |
| Pro Ala Leu Thr Arg Glu Leu Leu Gln Glu Met Val Ala Lys Phe Glu | 1700 | 1705 | 1710 |
| Ser Glu Thr Trp Arg Pro Leu Glu Thr Arg Val Thr Thr Ile Thr Glu | 1715 | 1720 | 1725 |
| Ser Val Glu Ala Phe Arg Thr Met Ala Gln Ala Arg His Ile Gly Lys | 1730 | 1735 | 1740 |
| Ile Val Met Ala Met Arg Asp Cys Ala Asn Ala Pro Ile Ala Pro Leu | 1745 | 1750 | 1755 |
| Arg Ser Ala Phe Asp Ser Glu Gly Thr Tyr Leu Ile Thr Gly Gly Leu | 1765 | 1770 | 1775 |

Gly Gly Leu Gly Leu Thr Val Ala Arg Trp Met Ile Gly Arg Gly Ala  
1780 1785 1790

Arg Arg Leu Val Leu Leu Ser Arg Arg Ala Pro Ser Pro Glu Val Gln  
1795 1800 1805

Gln Ala Ile Ala Val Met Asp Ala Asp Val Arg Thr Val Gln Ala Asp  
1810 1815 1820

Val Ser Gln Arg Asp Glu Leu Glu Arg Val Ile Ser Ser Ile Asp Arg  
1825 1830 1835 1840

Leu Arg Gly Val Ile His Ala Ala Ala Val Leu Asp Asp Ala Leu Leu  
1845 1850 1855

Leu Asn Gln Thr Glu Ala His Phe Arg Asn Val Met Ala Ala Lys Ile  
1860 1865 1870

Asp Gly Ala Trp Asn Leu His Leu Leu Thr Arg Asp Cys Pro Leu Asp  
1875 1880 1885

His Phe Val Leu Phe Ser Ser Ala Ala Gly Leu Leu Gly Ala Pro Ala  
1890 1895 1900

Gln Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Asn Ala Phe Leu Asp Ala Leu Ala Tyr  
1905 1910 1915 1920

Tyr Arg Lys Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu Ser Ile Gly Trp Gly Ala  
1925 1930 1935

Trp Ser Glu Val Gly Leu Ala Ala Ala Gln Asp Asn Arg Gly Ser Arg  
1940 1945 1950

Leu Ala Leu Arg Gly Met Glu Asn Leu Thr Pro Gln His Gly Leu Ala  
1955 1960 1965

Ile Leu Glu Gln Leu Leu Asn Ser Ser Ala Cys His Val Ala Ala Met  
1970 1975 1980

Pro Ile Asn Val Arg Gln Trp Arg Gln Phe Tyr Pro Lys Ala Ala Gln  
1985 1990 1995 2000

Ser Ala Leu Phe Glu Leu Leu His Asp Asp Ala Ala Ser Glu Ala Asp  
2005 2010 2015

Ala Pro Asn Ala Leu Arg Ala Arg Leu Gln Ser Ala Glu Pro Gln Thr  
2020 2025 2030

Arg Arg Thr Leu Leu Glu Glu His Leu Gln Gln Gln Leu Ala Arg Val  
2035 2040 2045

Leu Arg Ile Asp Ser Gln Thr Ile Asp Pro Leu Arg Pro Leu Lys Glu  
2050 2055 2060

Leu Gly Phe Asp Ser Leu Met Ala Leu Glu Phe Arg Asn Arg Leu Glu  
2065 2070 2075 2080

Leu Thr Leu Gly Leu Thr Leu Pro Ala Thr Leu Ile Trp Gly His Pro  
2085 2090 2095

Thr Leu Ala Gly Leu Ala Pro His Leu Ala Ser Gln Met Gly Leu Pro  
2100 2105 2110

Leu Val Glu Ala Gln Ala Ala Ala Ala Glu Gly Asp Ser Arg Ala  
2115 2120 2125

Met Lys Thr Ala Leu Ser Gly Leu Asp Asp Met Ser Glu Glu Ala Ala  
2130 2135 2140

Val Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ser  
2145 2150

<210> 125

<211> 1695

<212> PRT

<213> bacterie

<400> 125

Met Arg Glu Lys Ile Ala Pro Met Ser Ser Val Lys Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15

Ala Arg Asn Met Arg Gln Asn Ile Ala Gly Phe Asp Leu Val His Ala  
20 25 30

Glu Pro Ile Ala Ile Val Gly Met Ala Cys Arg Phe Pro Gly Gly Ala  
35 40 45

Lys Asn Pro Asp Ala Phe Trp Thr Leu Leu Lys Asn Gly Val Asp Gly  
50 55 60

Val Thr Glu Val Pro Pro Asp Arg Trp Asn Ser Asp Gln Tyr Tyr Ser  
65 70 75 80

Ser Asp Pro Asp Ala Pro Gly Lys Ala Tyr Ala Arg Tyr Ala Ala Phe  
85 90 95

Leu Glu Arg Ile Asp Gly Phe Asp Ala Glu Phe Phe Gly Ile Ser Pro  
100 105 110

Arg Glu Ala Leu Asn Met Asp Pro Gln Gln Arg Leu Leu Leu Glu Val  
 115 120 125  
 Cys Trp Glu Ala Ala Glu Asp Ala Gly Ile Ser Pro Gly Pro Leu Ala  
 130 135 140  
 Gly Ser Ala Thr Gly Val Phe Ala Gly Ser Cys Ala Gln Asp Phe Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Phe Gln Tyr Ala Asp Pro Ala Arg Ile Gly Ala Trp Ser Gly Ser  
 165 170 175  
 Gly Val Ala His Ser Met Leu Ala Asn Arg Ile Ser Tyr Leu Leu Asp  
 180 185 190  
 Leu Arg Gly Pro Ser Met Ala Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ala Leu  
 195 200 205  
 Val Ala Val His Leu Ala Cys Gln Ser Leu Arg Arg Arg Glu Cys Asp  
 210 215 220  
 Ala Ala Phe Ala Gly Gly Val Asn Leu Ile Leu Thr Pro Glu Gly Met  
 225 230 235 240  
 Ile Ala Leu Ser Lys Ala Arg Met Leu Ala Pro Asp Gly Arg Cys Lys  
 245 250 255  
 Thr Phe Asp Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Arg Gly Glu Gly Cys Gly  
 260 265 270  
 Ile Val Leu Leu Lys Arg Leu Ser Asp Ala Leu Ala Asp Gly Asp Ala  
 275 280 285  
 Ile Arg Ala Val Ile Arg Gly Ser Ala Ile Asn Gln Asp Gly Arg Ser  
 290 295 300  
 Asn Gly Ile Thr Ala Pro Asn Leu Gln Ala Gln Lys Ala Val Leu Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Val Ala Asn Ala His Ile Asp Pro Ser His Val Ser Leu Ile  
 325 330 335  
 Glu Ala His Gly Thr Gly Thr Ser Leu Gly Asp Pro Ile Glu Ile Glu  
 340 345 350  
 Ala Leu Gln Ser Val Tyr Asp Ala Pro Asp Ser Ala Pro Cys Leu Leu  
 355 360 365  
 Gly Ser Val Lys Thr Asn Ile Gly His Leu Glu Gly Ala Ala Gly Ile

|                     |                     |                         |
|---------------------|---------------------|-------------------------|
| 370                 | 375                 | 380                     |
| Ala Gly Leu Ile Lys | Ala Val Leu Ala Leu | Gln His Arg Thr Ile Pro |
| 385                 | 390                 | 395 400                 |
| Pro His Leu His Phe | Arg Arg Leu Asn Pro | Asn Ile Ser Leu Asp Gly |
|                     | 405                 | 410 415                 |
| Ser Arg Phe Arg Ile | Ala Thr Glu Ser Ser | Pro Trp Thr Ser Glu Gly |
|                     | 420                 | 425 430                 |
| Arg Pro Arg Leu Ala | Gly Val Ser Ser Phe | Gly Phe Gly Gly Ser Asn |
|                     | 435                 | 440 445                 |
| Ala His Val Ile Leu | Glu Glu Ala Pro Ala | Leu Pro Leu Pro Lys Pro |
|                     | 450                 | 455 460                 |
| Val Thr Arg Pro Gln | Leu Leu Thr Leu Ser | Ala Arg Thr Asp Glu Ala |
|                     | 465                 | 470 475 480             |
| Leu Gly Glu Leu Ala | Gly His Phe Ala Glu | Phe Leu Gln Ser His Pro |
|                     | 485                 | 490 495                 |
| Asn Ala Leu Leu Ser | Asp Val Cys Phe Thr | Ser Gln Val Gly Arg Asp |
|                     | 500                 | 505 510                 |
| Ala Tyr Ser His Arg | Leu Ala Ile Thr Ala | Ala Asp Ala Ala Glu Ala |
|                     | 515                 | 520 525                 |
| Val Ala Ala Leu Ala | Ala Ala Pro Arg Arg | Glu Val Ser Leu Arg Arg |
|                     | 530                 | 535 540                 |
| Arg Pro Ala Ile Ala | Phe Leu Phe Thr Gly | Gln Gly Ala Gln Tyr Ala |
|                     | 545                 | 550 555 560             |
| Gly Met Gly Ala Glu | Leu Tyr Lys Thr Gln | Pro Val Phe Arg Asp Ala |
|                     | 565                 | 570 575                 |
| Leu Asp Arg Cys Ala | Asp Trp Leu Arg Pro | Gln Leu Asp Val Pro Leu |
|                     | 580                 | 585 590                 |
| Thr Val Leu Leu Phe | Glu Ser Val Ser Pro | Leu His Glu Thr Ala Tyr |
|                     | 595                 | 600 605                 |
| Thr Gln Pro Ala Met | Phe Ala Leu Glu Trp | Ala Leu Ala Gln Phe Trp |
|                     | 610                 | 615 620                 |
| Leu Ser Leu Gly Val | Arg Pro Asp Tyr Val | Leu Gly His Ser Leu Gly |
|                     | 625                 | 630 635 640             |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Tyr | Val | Ala | Ala | Cys | Val | Ala | Gly | Ala | Phe | Ser | Val | Glu | Asp | Gly | 645 | 650 | 655 |     |
| Leu | Arg | Leu | Val | Thr | Ala | Arg | Gly | Arg | Leu | Val | Asn | Ala | Leu | Pro | Arg | 660 | 665 | 670 |     |
| Gly | Lys | Ala | Val | Ile | Val | His | Ala | Asn | Pro | Ser | Arg | Ile | Ala | Ala | Leu | 675 | 680 | 685 |     |
| Ala | Ala | Lys | Val | Ala | Val | Ala | Ala | Ser | Asn | Ala | Pro | Asp | Arg | Thr | Val | 690 | 695 | 700 |     |
| Ile | Ser | Gly | Thr | Ala | Ala | Glu | Ile | Ala | Glu | Ala | Gln | Asp | Asp | Leu | His | 705 | 710 | 715 | 720 |
| Arg | Ala | Gly | Val | Glu | Thr | Arg | Glu | Leu | Asn | Val | Ser | His | Ala | Phe | His | 725 | 730 | 735 |     |
| Ser | Pro | Leu | Met | Asp | Pro | Ile | Leu | Asp | Lys | Phe | Glu | Ala | Leu | Ala | Gly | 740 | 745 | 750 |     |
| Ala | Ile | Ala | Tyr | Gln | Pro | Leu | Ala | Ile | Pro | Leu | Val | Ser | Asn | Val | Ser | 755 | 760 | 765 |     |
| Gly | Ala | Val | Leu | Pro | Lys | Gly | Thr | Thr | Leu | Asp | Ala | Arg | Tyr | Trp | Arg | 770 | 775 | 780 |     |
| Arg | Gln | Leu | Arg | Glu | Thr | Val | Gln | Phe | Glu | Ser | Ala | Met | Arg | Thr | Leu | 785 | 790 | 795 | 800 |
| Ala | Asp | Arg | Glu | Cys | Lys | Leu | Phe | Leu | Glu | Ile | Gly | Pro | His | Pro | Thr | 805 | 810 | 815 |     |
| Leu | Thr | Thr | Leu | Gly | Arg | Tyr | Cys | Leu | Pro | Asp | Asp | Gly | Ala | Val | Trp | 820 | 825 | 830 |     |
| Leu | His | Ser | Leu | Ser | Lys | Gly | Arg | Ser | Asp | Trp | Ser | Val | Leu | Leu | Glu | 835 | 840 | 845 |     |
| Ser | Leu | Gly | Gly | Leu | Phe | Thr | Ala | Gly | Val | Asn | Pro | Asp | Trp | Arg | Gly | 850 | 855 | 860 |     |
| Leu | Tyr | Ala | Gly | Glu | Ser | Pro | Ser | Arg | Val | Ala | Leu | Pro | Thr | Tyr | Pro | 865 | 870 | 875 | 880 |
| Phe | Gln | Arg | Asp | Thr | Phe | Ser | Leu | Arg | Arg | Val | Pro | Ala | Arg | Glu | Pro | 885 | 890 | 895 |     |
| Ala | Arg | Gly | Gly | Met | Leu | Gly | Ala | Arg | Leu | Asn | Ser | Ala | Leu | Gly | Asp | 900 | 905 | 910 |     |

Val Ile Phe Glu Asn Ser Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Leu His Glu  
915 920 925

His Val Ile Tyr Asp Ala Val Ile Val Pro Gly Ala Trp His Val Ser  
930 935 940

Ala Phe Leu Glu Ala Ala Gln Glu Val Phe Gly Pro Val Pro Cys Ala  
945 950 955 960

Val Ser Asp Val Met Met Arg Gln Ala Leu Ala Ile Pro Pro Asp Thr  
965 970 975

Pro Val Thr Val Gln Ala Ile Val Thr Pro Gly Glu Asp Gly Glu Ala  
980 985 990

Lys Val Gln Val Phe Ser Gln Asp Gly Asp Ser Trp Lys Leu His Thr  
995 1000 1005

Ala Ala Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ala Gly Ala Val His Phe Glu Leu  
1010 1015 1020

Pro Ala Gln Pro Ser Glu Val Ile Ser Gly Asp Ala Phe Tyr Gly Ala  
1025 1030 1035 1040

Met Asn Ala Arg Gly Val Asp Leu Gly Pro Ala Phe Ser Trp Val Glu  
1045 1050 1055

Glu Val Trp Arg Arg Asp Gly Glu Ala Leu Gly Arg Met Arg Leu Pro  
1060 1065 1070

Val Ala Glu Asp Gly Ala Asn Ala Tyr Arg Leu His Pro Gly Leu Ile  
1075 1080 1085

Asp Ser Cys Phe Gln Val Phe Gly Ala Thr Trp Pro Ala Glu Arg Cys  
1090 1095 1100

Gln Pro Gly Ala Tyr Val Pro Val Gly Ile Glu Ala Val Arg Phe Tyr  
1105 1110 1115 1120

Arg Pro Pro Ala Gly Ser Leu Arg Cys His Ala Arg Leu Arg Pro Ser  
1125 1130 1135

Ser Ser Gly Pro Phe Val Gly Asp Leu Thr Leu Val Glu Glu Thr Gly  
1140 1145 1150

Ala Val Ile Ala Glu Phe Ser Gly Leu Ala Val Met His Ala Gly Thr  
1155 1160 1165

Leu Gln Ser Ala Gln Ser Trp Leu Gln Asp Val Gln Trp Gln Glu Cys



1170 1175 1180  
Glu Arg Ser Thr Thr Leu Lys Ser Asp Gly Pro Gly Lys Pro Glu Asp  
1185 1190 1195 1200  
Trp Leu Leu Cys Ala Gly Ala Asp Asp Val Ala Gly Leu Met Pro Gln  
1205 1210 1215  
Glu Leu Arg Val Val Ser Gly Val Thr Leu Arg Gln Ala Leu Glu Gln  
1220 1225 1230  
Thr Gln Thr Leu Val Gly Arg Pro Ala Arg Leu Trp Leu Ile Thr Arg  
1235 1240 1245  
Gly Val His Arg Ile Ser Asp Asp Ala Thr Pro Val Asp Pro Phe  
1250 1255 1260  
Gln Ala Pro Leu Trp Gly Leu Gly Gln Ala Ile Ala Arg Glu His Pro  
1265 1270 1275 1280  
Glu Leu Trp Gly Gly Leu Ile Asp Leu Gly Cys Asp Asn Ala Asp Ile  
1285 1290 1295  
Ala Ala Ala Met Leu Leu Asp Glu Ile Arg Tyr Ala Gly Asp Asp Lys  
1300 1305 1310  
Ala Ile Ala Leu Arg Asn Gly Arg Arg Tyr Val Arg Arg Leu Val Arg  
1315 1320 1325  
His Lys Glu Thr Ser Lys Arg Pro Pro Ala Ile Ser Ala Asp Gly Val  
1330 1335 1340  
yr Leu Ile Thr Gly Gly Leu Gly Ala Leu Gly Arg Arg Val Ala Arg  
1345 1350 1355 1360  
Arg Leu Ile Glu Gln Gly Ala Arg Arg Leu Val Leu Val Gly Arg His  
1365 1370 1375  
Thr Glu Ala Val Ala Asp Leu Glu Gln Leu Gly Ala Ala Val Met Val  
1380 1385 1390  
Ala Ala Cys Asp Val Ser Ser Glu Gln Gln Leu Ala Ala Leu Leu Ala  
1395 1400 1405  
Asp Pro Arg Thr Gln Pro Leu Arg Gly Val Val His Ala Ala Gly Val  
1410 1415 1420  
Leu Asp Asp Gly Val Val Thr Glu Gln Thr Trp Ala Arg Phe Glu Lys  
1425 1430 1435 1440

Val Leu Ala Pro Lys Leu Gln Gly Ala Trp Asn Leu His Gln Leu Thr  
1445 1450 1455

Arg His His Ala Leu Asp Phe Phe Val Leu Phe Ser Ser Ala Ala Ser  
1460 1465 1470

Leu Leu Gly Ser Ala Gly Gln Ser Asn Tyr Ser Ala Ala Asn Ala Phe  
1475 1480 1485

Leu Asp Ser Leu Ala His Met Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu  
1490 1495 1500

Ser Ile Asn Trp Gly Pro Trp Ala Gly Glu Gly Met Ala Ala Arg Ile  
1505 1510 1515 1520

Ala Arg Gln Gly Leu Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro Pro Glu Val Gly  
1525 1530 1535

Ala Arg Ile Phe Gly Asp Leu Leu Gly Glu Thr Ala Ala Gln Ile Ala  
1540 1545 1550

Val Phe Gln Val Ser Ala Glu Lys Arg Arg Ser Pro Ala Ser Asp Pro  
1555 1560 1565

Gly Phe Ile Gln Gln Leu Thr Glu Ala Ala Pro Glu Arg Arg Gln Glu  
1570 1575 1580

Leu Leu Gln Met Arg Ile Arg Lys Gln Ala Gly Gly Val Leu Ala Leu  
1585 1590 1595 1600

Asp Ala Ser Lys Thr Leu Asp Pro Arg Arg Pro Leu Lys Glu Tyr Gly  
1605 1610 1615

Leu Asp Ser Leu Met Ala Leu Asp Leu Ala Arg Ala Ile Gly Glu Leu  
1620 1625 1630

Val Arg Lys Ser Leu Pro Ala Thr Leu Leu Tyr Asp His Pro Thr Val  
1635 1640 1645

Glu Lys Leu Ala Gly His Val Leu Arg Glu Leu Gly Leu Asp Val Pro  
1650 1655 1660

Ser Asp Ser Leu Val Asp Glu Val Arg Gln Leu Ser Glu Gln Glu Met  
1665 1670 1675 1680

Ala Ala Phe Ile Thr Glu Thr Leu His His Leu Gly Glu Glu Arg  
1685 1690 1695

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 1434

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; bacterie

&lt;400&gt; 126

Met Ser Asp Leu Thr Pro Leu Gln Gln Ala Val Leu Ala Leu Lys Arg  
1 5 10 15

Thr Arg Ala Arg Leu Asp Glu Leu Glu Ser Val His Asn Glu Pro Ile  
20 25 30

Ala Ile Val Gly Met Ala Cys Arg Phe Pro Gly Ala Asp Ser Pro Glu  
35 40 45

Ala Phe Trp Gln Leu Leu His Asp Gly Ile Asp Ala Ile Arg Glu Ile  
50 55 60

Pro Ala Gly Arg Trp Asp Ala Asp Ala Phe Tyr Asp Pro Asp Pro Asn  
65 70 75 80

Ala Pro Gly Lys Met Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Phe Leu Asp Gly Ala  
85 90 95

Val Asp Gly Phe Asp Ala Gly Phe Phe Gly Ile Thr Pro Arg Glu Val  
100 105 110

Ala Gly Leu Asp Pro Gln Gln Arg Leu Leu Leu Glu Val Ala Trp Glu  
115 120 125

Ala Leu Glu Arg Ala Gly Arg Pro Pro Asp Ser Leu Ala Gly Ser Asp  
130 135 140

Thr Gly Val Phe Ile Gly Ile Ser Thr Asp Asp Tyr Ser Arg Leu Lys  
145 150 155 160

Pro Thr Asp Pro Ala Leu Ile Asp Ala Tyr Thr Gly Thr Gly Thr Ala  
165 170 175

Phe Ser Thr Ala Ala Gly Arg Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Gln Gly  
180 185 190

Pro Asn Phe Pro Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Val  
195 200 205

His Leu Ala Cys Arg Ser Leu Gln Ser Arg Glu Cys Ser Met Ala Leu  
210 215 220

Ala Gly Gly Val Asn Leu Ile Leu Ala Pro Glu Ser Thr Ile Tyr Phe  
225 230 235 240

Cys Arg Leu Arg Ala Met Ala Ala Asp Gly Arg Cys Lys Ser Phe Ala  
245 250 255

Ala Ser Ala Asp Gly Tyr Gly Arg Gly Glu Gly Cys Gly Met Leu Val  
260 265 270

Leu Lys Arg Leu Ser Asp Ala Thr Arg Asp Gly Asp Arg Ile Leu Ala  
275 280 285

Leu Ile Arg Gly Ser Ala Val Asn His Gly Gly Arg Ser Asn Gly Leu  
290 295 300

Thr Ala Pro Asn Gly Pro Ala Gln Glu Ala Val Ile Arg Ala Ala Leu  
305 310 315 320

Lys Asn Ala Gly Met Ala Pro Ala Asp Val Asp Tyr Val Glu Ala His  
325 330 335

Gly Thr Gly Thr Pro Leu Gly Asp Pro Ile Glu Leu Arg Ala Met Ala  
340 345 350

Ala Val Leu Gly Glu Gly Arg Ala Val Asp Ser Pro Leu Ile Val Gly  
355 360 365

Ser Val Lys Thr Asn Phe Gly His Leu Glu Ala Ala Ala Gly Ile Ala  
370 375 380

Gly Leu Ile Lys Thr Ile Leu Ala Leu Gln His Arg Glu Ile Pro Pro  
385 390 395 400

His Leu His Phe Asn Ala Pro Asn Pro His Val Leu Trp Asn Glu Leu  
405 410 415

Pro Leu Lys Ile Ala Thr Ala Cys Ser Pro Trp Pro Ser Asn Gly Arg  
420 425 430

Pro Arg Val Ala Gly Val Ser Ser Phe Gly Ile Ser Gly Thr Asn Ser  
435 440 445

His Val Val Leu Ala Glu Ala Lys Thr Asn Val Glu Ala Lys Thr Asn  
450 455 460

Val Glu Ala Lys Thr Asn Val Glu Ala Lys Thr Ser Glu Glu Val Lys  
465 470 475 480

Ala Ser Val Glu Ala Lys Gly Asn Val Glu Ala Lys Ala Ser Ala Ser  
485 490 495

Val Pro Leu Leu Glu Gly Asp Ser Arg Pro Arg Ser Gly Gly Gly Gly

| 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Arg | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Val | Pro | Val | Pro | Asp | Gln | Leu |
|     | 515 |     |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| His | Ala | Glu | Asp | Gly | Arg | Glu | Tyr | Leu | Leu | Pro | Leu | Ser | Ala | Arg | His |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Pro | Gln | Ala | Leu | Arg | Asp | Leu | Ala | Gly | Ala | Tyr | Arg | Asp | Gly | Arg | Phe |
|     | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     | 560 |
| His | Ala | Pro | Leu | Ser | Ala | Leu | Cys | Ser | Ala | Ala | Ser | Leu | Thr | Arg | Ser |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| His | Tyr | Glu | His | Arg | Ala | Ala | Phe | Val | Ala | Ser | Ser | Leu | Pro | Glu | Phe |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Asn | Gln | Leu | Leu | Glu | Ala | Phe | Arg | Arg | Asn | Glu | Thr | Asn | Arg | Gly | Val |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Ala | Thr | Gly | Phe | Ala | Asp | Pro | Gly | Val | Arg | Pro | Lys | Leu | Ala | Phe | Ile |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Phe | Ser | Gly | Gln | Gly | Gly | Gln | Tyr | Pro | Arg | Met | Ala | Tyr | Arg | Leu | Tyr |
|     | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |
| Ser | Asp | Glu | Pro | Val | Phe | Arg | Ser | Ala | Ile | Glu | Arg | Cys | Asp | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Phe | Arg | Ser | Phe | Val | Glu | Trp | Arg | Leu | Ala | Asp | Leu | Leu | Ala | Asp | Glu |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |
| er  | Gly | Ala | Trp | Leu | Ser | Gln | Ile | Asp | Arg | Val | Gln | Pro | Ala | Leu | Phe |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Ala | Val | Gln | Ile | Ala | Leu | Val | Glu | Leu | Leu | Gln | Ser | Trp | Gly | Ile | Arg |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |
| Pro | Asp | Gly | Val | Ala | Gly | His | Ser | Met | Gly | Glu | Val | Ala | Ala | Ala | His |
|     | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |
| Val | Ala | Gly | Ile | Leu | Thr | Leu | Glu | Asp | Ala | Ala | Arg | Ile | Ile | Cys | Arg |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Arg | Ser | Arg | Leu | Leu | Leu | Gly | Leu | Arg | Gly | Arg | Gly | Ala | Met | Ala | Leu |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |
| Val | Glu | Leu | Pro | Leu | Asp | Arg | Ala | Lys | Ala | Val | Leu | Ala | Glu | Arg | Gly |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |

Leu Thr Thr Val Ser Val Ala Ala Ser Asn Gly Pro Arg Ser Thr Val  
770 775 780

Phe Ser Gly Asp Arg Val Ala Leu Glu His Leu Lys Asp Asp Phe Glu  
785 790 795 800

Arg Arg Gly Val Phe Cys Arg Leu Ile Gln Val Asp Val Ala Ser His  
805 810 815

Ser Ser Gln Val Asp Pro Leu Glu Asn Glu Leu Arg Gln Glu Leu Gly  
820 825 830

Arg Val Ile Ala Lys Arg Ser Ala Val Pro Phe Phe Ser Thr Val Glu  
835 840 845

Gly Gln Leu Ser Thr Gly Glu Ala Cys Asp Ala Ser Tyr Trp Val Ala  
850 855 860

Asn Leu Arg Gln Pro Val Arg Phe Trp Glu Ser Leu Gln Ala Met Ala  
865 870 875 880

Gly Asp Glu Phe Thr Gln Phe Leu Glu Ile Ser Pro His Pro Val Leu  
885 890 895

Thr Pro Ser Ile Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Gly Ile Asn Gly Leu  
900 905 910

Val Arg Pro Val Leu Arg Arg Asp Glu Pro Glu Arg Arg Glu Leu Leu  
915 920 925

Glu Leu Leu Ala Ala Leu Tyr Val Asn Gly Gln Arg Pro Asp Trp Arg  
930 935 940

Ala Leu Ala Ser Ser Pro Asp Thr Arg Leu Asp Leu Pro Thr Tyr Pro  
945 950 955 960

Trp Gln Arg Glu Arg Phe Trp Phe Ala Thr Ser Thr Arg Arg Ser Leu  
965 970 975

Pro Ala Val Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Arg Lys Val Glu Ile Ala  
980 985 990

Leu Ala Pro Asp Thr His Val Trp Glu Ser Val Leu Ser Leu Asp Ala  
995 1000 1005

Leu Pro Phe Leu Ala Asp His Arg Leu Asn Glu Leu Val Val Leu Pro  
1010 1015 1020

Gly Ala Ala Tyr Val Glu Met Ala Leu Ala Ala Ala Lys Glu Val Phe  
1025 1030 1035 1040

Ala Gly Gly Cys Ser Leu Glu Glu Ile Arg Phe Glu Gln Met Leu Val  
1045 1050 1055

Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Arg Val Gln Val Ile Leu Glu Gly His  
1060 1065 1070

Ala Phe Arg Ile Ser Ser Leu Ala Glu Gly Gly Ser Asp Trp Thr Glu  
1075 1080 1085

His Ala Arg Gly Thr Met Ala Ala Ala Pro Asp Lys Val Ala Pro Thr  
1090 1095 1100

Val Ser Leu Pro Thr Leu Gly Asp Arg Ile Glu Gly Asp Asp Phe Tyr  
1105 1110 1115 1120

Ala Ala Phe Ala Ser Gln Gly Met His Tyr Gly Asp Thr Phe Arg Gly  
1125 1130 1135

Ile Ala Glu Val Trp Arg Arg Asp Gly Glu Ala Val Ala Arg Leu Ser  
1140 1145 1150

Val Pro Asp Ala Val Arg Glu Ala Glu Ser Gly Tyr Thr Leu His Pro  
1155 1160 1165

Ala Leu Leu Asp Ala Cys Leu Gln Val Leu Gly Ala Thr Leu Gly Gly  
1170 1175 1180

Glu Gly Ser Ala Gly Pro Cys Val Pro Val Ala Ile Glu Arg Leu His  
1185 1190 1195 1200

Cys Phe Gly Arg Pro Ala Gly Asp Leu Arg Val His Ala Arg Leu Thr  
1205 1210 1215

Gly Arg Leu Glu Gly Asp Val Thr Leu Cys Asp Ala Glu Gly His Val  
1220 1225 1230

Ile Leu Glu Val Gln Gly Leu Arg Ala Gln Glu Leu Glu Arg Gln Ser  
1235 1240 1245

Glu Trp Phe His Ala Met Glu Trp Glu Pro Gln Leu Leu Ala Glu Ser  
1250 1255 1260

Pro Thr Ala Thr Val Ser Gly Ala Trp Leu Val Ile Ala Asp Ala Gly  
1265 1270 1275 1280

Gly Ile Ala Ala Ala Val Ala Arg Gly Leu Gly Thr Asn Thr Val Val  
1285 1290 1295

Ile Ser Gly Arg Asp Ala Glu Ile Pro Asp Gln Pro Tyr Arg Gly Val

| 1300                                                                    | 1305 | 1310      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|-----------|
| Ile His Cys Gly Ser Leu Asp Glu Thr Glu Asp Glu Thr Asp Pro Ser<br>1315 | 1320 | 1325      |
| Ala Ala Gly Gly Thr Ala Cys Glu Asp Ile Leu Arg Ile Val Gln Glu<br>1330 | 1335 | 1340      |
| Phe Gly Val Gly Arg Ile Gln Leu Thr Lys Gln Ala Ser Asp Ala Glu<br>1345 | 1350 | 1355 1360 |
| Ser Gln His Pro Arg Ile Trp Leu Ile Thr Ala Gly Val His Ala Glu<br>1365 | 1370 | 1375      |
| His Leu Gln Met Pro Val Val Pro Ala Arg Ala Pro Val Trp Gly Leu<br>1380 | 1385 | 1390      |
| Gly Arg Thr Ile Ala Ala Glu His Pro Glu Phe Ala Cys Thr Cys Ile<br>1395 | 1400 | 1405      |
| Asp Leu Asp Thr Ala Gly Glu Val Glu Val Gln Ala Leu Cys Arg Glu<br>1410 | 1415 | 1420      |
| Ile Leu Ala Gly Ser Ser Glu Arg Gln Gly<br>1425                         | 1430 |           |



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 juin 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/040497 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/10, 15/52, 9/00, C12Q 1/68

60/209,800 7 juin 2000 (07.06.2000) US

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR00/03311

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

(22) Date de dépôt international :  
27 novembre 2000 (27.11.2000)

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JEAN-  
NIN, Pascale [FR/FR]; 52, rue Pierre Louvriér, F-92140  
Meudon (FR). PERNODET, Jean-Luc [FR/FR]; 21,  
rue des Jardins, F-94230 Cachan (FR). GUERINEAU,  
Michel [FR/FR]; 79, boulevard Saint Marcel, F-75013  
Paris (FR). SIMONET, Pascal [FR/FR]; 55, rue Pierre  
Voyant, F-69100 Villeurbanne (FR). COURTOIS, Sophie  
[FR/FR]; 165, rue de Paris, F-94220 Charenton le Pont

(25) Langue de dépôt : français

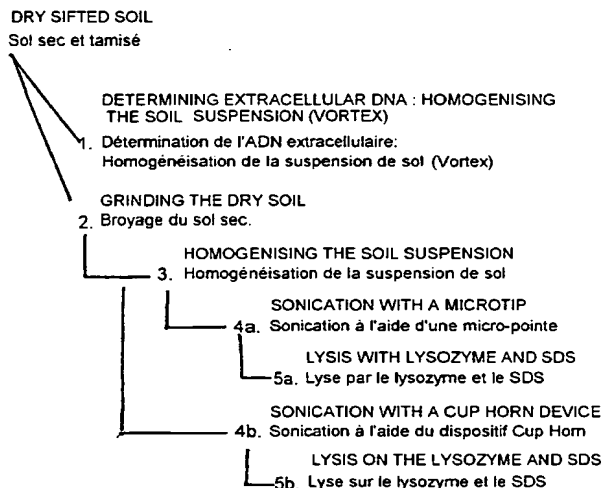
(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
99/15032 29 novembre 1999 (29.11.1999) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING NUCLEIC ACIDS FROM AN ENVIRONMENT SAMPLE

(54) Titre : PROCÉDE D'OBTENTION D'ACIDES NUCLEIQUES A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE L'ENVIRONNE-  
MENT



(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing nucleic acids from an environment sample, more particularly a method for obtaining a library of nucleic acids from a sample. The invention also concerns nucleic acids of nucleic acid libraries obtained by said method their use in the synthesis of novel compounds, in particular novel compounds of therapeutic interest. The invent further concerns novel means used in the method for obtaining said nucleic acids, such as novel vectors and novel processes for preparing such vectors or recombinant host cells containing said nucleic acid. Finally, the invention concerns methods for detecting a nucleic acid of interest within a library of nucleic acids resulting from said method, and nucleic acids detected by said method and polypeptides encoded by said nucleic acids.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de préparation d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, plus particulièrement un procédé d'obtention d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon. L'invention est également relative aux acides nucléiques ou aux collections d'acides nucléiques obtenus selon le procédé et leur application à la synthèse

[Suite sur la page suivante]

WO 01/040497 A3



(FR). **CAPPELLANO, Carmela** [FR/FR]; 16, rue de Neuilly, F-94120 Fontenay sous Bois (FR). **FRANCOU, François** [FR/FR]; 76, boulevard de Lozère, F-91120 Palaiseau (FR). **RAYNAL, Alain** [FR/FR]; 52, avenue des Tilleuls, F-91440 Bures sur Yvette (FR). **BALL, Maria** [VE/VE]; Avenue Cardenal Quintera, Res. Cardenal Quintero, Edif. 10, Piso 4, Apto 42, Merida. Edo., Merida (VE). **SEZONOV, Guennadi** [RU/FR]; 16, rue Saint Sauveur, F-75002 Paris (FR). **TUPHILE, Karine** [FR/FR]; 39/41, boulevard Dubreuil, F-91400 Orsay (FR). **FROSTEGARD, Asa** [NO/NO]; Flateby Skogsvei 7, N-1450 Nesoddtangen (NO).

LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **États désignés (régional)** : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

(74) **Mandataire : BOUVET, Philippe**; Aventis Pharma S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).

(88) **Date de publication du rapport de recherche internationale:**

17 octobre 2002

(81) **États désignés (national)** : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

de nouveaux composés, notamment de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique. L'invention a également pour objet les moyens nouveaux mis en oeuvre dans le procédé d'obtention d'acides nucléiques ci-dessus, tels que de nouveaux vecteurs et des nouveaux procédés de préparation de tels vecteurs ou encore des cellules hôtes recombinantes comprenant un acide nucléique de l'invention. L'invention concerne encore des procédés pour détecter un acide nucléique d'intérêt au sein d'une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé ci-dessus, ainsi que les acides nucléiques détectés par un tel procédé et les polypeptides codés par de tels acides nucléiques.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/TR 00/03311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C12N15/52 C12N9/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No.                            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| X          | <p>WO 96 34112 A (CHROMAXOME CORP)<br/>31 October 1996 (1996-10-31)<br/>cited in the application</p> <p>page 72 -page 76<br/>page 84, line 30 -page 91, line 22<br/>claims</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | <p>1,6,7,<br/>10,11,<br/>30,54,<br/>61,63-67</p> |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2001

Date of mailing of the international search report

15.06.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ANDRES S.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No

PCT/FR 00/03311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No.      |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X          | SEOW KAH-TONG ET AL: "A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 179, no. 23, December 1997 (1997-12),<br>pages 7360-7368, XP002148456<br>ISSN: 0021-9193<br>cited in the application<br>the whole document | 7,8,10,<br>30,61,<br>63-67 |
| X          | WO 99 20799 A (RONDON MICHELLE R<br>;HANDELSMAN JO (US); GOODMAN ROBERT M<br>(US); WISC) 29 April 1999 (1999-04-29)<br>cited in the application<br>examples 4,6<br>page 5, line 15 -page 6<br>page 17 -page 29<br>page 36 -page 48<br>claims                                                                                                                         | 7-11,30,<br>61,65,67       |
| A          | PAGET ERIC ET AL: "The fate of recombinant plant DNA in soil."<br>EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY,<br>vol. 34, no. 2, April 1998 (1998-04),<br>pages 81-88, XP000946574<br>ISSN: 1164-5563<br>page 83, paragraph 2.3.                                                                                                                                               | 1,3-6                      |
| A          | MILLER DN. ET AL.: "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples."<br>APPL ENVIRON MICROBIOL 1999<br>NOV;65(11):4715-24,<br>XP002148457<br>the whole document                                                                                                                                             | 1,3-6                      |
| A          | CLERC SYLVIE ET AL: "Efficiency of the transfer of a pSAM2-derivative plasmid between two strains of Streptomyces lividans in conditions ranging from agar slants to non-sterile soil microcosms."<br>FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY,<br>vol. 21, no. 3, 1996, pages 157-165,<br>XP000946441<br>ISSN: 0168-6496<br>the whole document                                     | 7-21,<br>42-53             |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/03311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.     |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| A          | PICARD C ET AL: "DETECTION AND ENUMERATION OF BACTERIA IN SOIL BY DIRECT DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 58, no. 9, 1992, pages 2717-2722,<br>XP000946427<br>ISSN: 0099-2240<br>cited in the application.<br>the whole document<br>---                                  | 1,3-6                     |
| A          | US 4 900 677 A (HEWITT PETER L)<br>13 February 1990 (1990-02-13)<br>examples<br>---                                                                                                                                                                                                                                                      | 1,3-6                     |
| A          | RAYNAL A. ET AL.: "Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: Functional analysis in Escherichia coli."<br>MOLECULAR MICROBIOLOGY,<br>vol. 28, no. 2, April 1998 (1998-04),<br>pages 333-342, XP002166432<br>ISSN: 0950-382X<br>cited in the application<br>the whole document<br>---                                        | 12-21,<br>42-53           |
| A          | MAIDAK BONNIE L ET AL: "A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)."<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 27, no. 1,<br>1 January 1999 (1999-01-01), pages<br>171-173, XP002166433<br>ISSN: 0305-1048<br>cited in the application<br>---                                                                                        |                           |
| P,X        | FROSTEGARD ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 65, no. 12, December 1999 (1999-12),<br>pages 5409-5420, XP002148458<br>ISSN: 0099-2240<br>page 5410, left-hand column, line 32 -page<br>5412, right-hand column, line 12<br>--- | 1,3,6,<br>30,61,<br>63,64 |
| P,X        | WO 99 67374 A (CAPPELLANO CARMELA ;GIUSINO FRANCESCO (IT); PUGLIA ANNA MARIA (IT))<br>29 December 1999 (1999-12-29)<br>cited in the application<br>---                                                                                                                                                                                   | 30,54,<br>61-67           |
| P,A        | the whole document<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 42-53                     |
|            | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/03311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X        | <p>FROSTEGARD, ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils"<br/>APPL. ENVIRON. MICROBIOL. (1999), 65(12), 5409-5420,<br/>XP002166435<br/>the whole document -----</p> | 1,3-6,30              |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00/03311

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **25 28 29 41 54-60 62-68**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplementary sheet FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM  
PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplementary sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims: 1, 3, 5 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-40 (all partly)

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims nos.: 25, 28, 29, 41, 54-60, 62-68

Claims 25, 28 and 55 concern a vector which is only defined by its presence in a collection of vectors or by the fact that it contains a nucleic acid derived from a collection of nucleic acids. Since it does not have any structural characteristic or any other property enabling a meaningful search, those claims were not searched. The same applies to Claims (or parts of claims) 29, 41, 54 to 60 and 62 to 67 which are dependent thereon. Claim 68 concerns a compound characterised by the method for obtaining it, and thereby includes all the compounds capable of being obtained by said method. Once again, there is no characteristic enabling a meaningful search. Moreover, the method itself (being dependent on Claim 62) is based on compounds which are not defined. Therefore no search was carried for Claim 68.

The applicant's attention is drawn to the fact that, claims or parts of claims, relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.



The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

Invention 1.: Claims 1, 3-5 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-68 (all partly)

Method for preparing a collection of nucleic acids from a soil sample, such as described in Claim 1; vectors and host cells containing same. Use of said collection for detecting a nucleic acid of interest, a compound synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said compound.

Invention 2. : Claims 2 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-68 (all partly)

Method for preparing a collection of nucleic acids from an environment sample, such as described in Claim 2; vectors and host cells containing same. Use of said collection for detecting a nucleic acid of interest, a compound synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said compound.

Invention 3.: Claims 22-24 (completely) and 29 and 41 (all partly)

Preparation of a recombinant vector as per Claim 22.

Invention 4. : Claims 26-27 (completely) and 29 and 41 (all partly)

Method for preparing a recombinant vector as per Claim 26

Invention 5. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Nucleic acid characterised by SEQ ID 30 and host cells containing and expressing same, their use for detecting a nucleic acid of interest, a polyketide synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said polyketide.

Inventions 6. to 20. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Same as for subject 5., but with reference to SEQ ID's 31 to 44 respectively.

Invention 21. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Same as for subject 5., but with reference to nucleic acids characterised by SEQ ID's 115 to 120

Invention 22. : Claims 31-34, 36-38, 41, 56-50, 62-69, 71-72 (all partly) and 39 and 40 (completely)

Nucleic acids other than SEQ ID's 30 to 44, 60 to 106, 115 to 120, vectors and host cells containing same, their uses for detecting nucleic acids of interest, of compounds synthesized by the proteins encoded by said nucleic acids, or cells producing said compounds.

Invention 23. : Claims 73 to 75

Method for determining diversity of nucleic acids contained in a collection

Invention 24. : Claim 76 (partly)

Nucleic acid comprising an rDNA 16S sequence having at least 99% identity with SEQ ID 60.

Invention 25. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 61, 64, and 101

Invention 26. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 62 and 69.

Invention 27. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 63, 68 and 102.

Invention 28. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 65.

Invention 29. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 66, 90 and 96.

Invention 30. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 67. and 91.

Invention 31. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 70, 80, 81, 97 and 103.

Invention 32. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 71 and 100.

Invention 33. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 72 and 99.

Invention 34. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 73, 82, 88 and 89.

Invention 35. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 74.

Invention 36. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 75.

Invention 37. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 76.

Invention 38. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 77.

Invention 39. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 78.

Invention 40. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 79.

Invention 41. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 83, 104 and 105.

Invention 42. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 84.

Invention 43. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 85 and 92.

Invention 44. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 86, 95 and 98.

Invention 45. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 87 and 106.

Invention 46. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 93 and 94.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 00/03311

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                   | Publication<br>date                                                                            |
|-------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 9634112 A                              | 31-10-1996          | AU 723619 B<br>AU 5804996 A<br>CA 2219136 A<br>EP 0822990 A<br>HU 9801871 A<br>JP 11504218 T<br>US 5824485 A | 31-08-2000<br>18-11-1996<br>31-10-1996<br>11-02-1998<br>30-11-1998<br>20-04-1999<br>20-10-1998 |
| WO 9920799 A                              | 29-04-1999          | AU 1119399 A<br>EP 1023466 A                                                                                 | 10-05-1999<br>02-08-2000                                                                       |
| US 4900677 A                              | 13-02-1990          | EP 0261956 A<br>JP 63091093 A                                                                                | 30-03-1988<br>21-04-1988                                                                       |
| WO 9967374 A                              | 29-12-1999          | AU 4609699 A<br>EP 1090113 A                                                                                 | 10-01-2000<br>11-04-2001                                                                       |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/R 00/03311

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12N15/10 C12N15/52 C12N9/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                      | no. des revendications visées                    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| X           | <p>WO 96 34112 A (CHROMAXOME CORP)<br/>31 octobre 1996 (1996-10-31)<br/>cité dans la demande</p> <p>page 72 -page 76<br/>page 84, ligne 30 -page 91, ligne 22<br/>revendications</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | <p>1,6,7,<br/>10,11,<br/>30,54,<br/>61,63-67</p> |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de documents

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mai 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15.06.01

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ANDRES S.M.

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                               |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie *                                     | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                                             | no. des revendications visées |
| X                                               | SEOW KAH-TONG ET AL: "A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 179, no. 23, décembre 1997 (1997-12),<br>pages 7360-7368, XP002148456<br>ISSN: 0021-9193<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>--- | 7,8,10,<br>30,61,<br>63-67    |
| X                                               | WO 99 20799 A (RONDON MICHELLE R<br>;HANDELSMAN JO (US); GOODMAN ROBERT M<br>(US); WISC) 29 avril 1999 (1999-04-29)<br>cité dans la demande<br>exemples 4,6<br>page 5, ligne 15 -page 6<br>page 17 -page 29<br>page 36 -page 48<br>revendications<br>---                                                                                                                   | 7-11,30,<br>61,65,67          |
| A                                               | PAGET ERIC ET AL: "The fate of recombinant plant DNA in soil."<br>EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY,<br>vol. 34, no. 2, avril 1998 (1998-04),<br>pages 81-88, XP000946574<br>ISSN: 1164-5563<br>page 83, alinéa 2.3.<br>---                                                                                                                                                 | 1,3-6                         |
| A                                               | MILLER DN. ET AL.: "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples."<br>APPL ENVIRON MICROBIOL 1999<br>NOV;65(11):4715-24,<br>XP002148457<br>le document en entier<br>---                                                                                                                                         | 1,3-6                         |
| A                                               | CLERC SYLVIE ET AL: "Efficiency of the transfer of a pSAM2-derivative plasmid between two strains of Streptomyces lividans in conditions ranging from agar slants to non-sterile soil microcosms."<br>FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY,<br>vol. 21, no. 3, 1996, pages 157-165,<br>XP000946441<br>ISSN: 0168-6496<br>le document en entier<br>---                                 | 7-21,<br>42-53                |
|                                                 | ---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                               |

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR/03311

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                               |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                        | no. des revendications visées |
| A                                               | PICARD C ET AL: "DETECTION AND ENUMERATION OF BACTERIA IN SOIL BY DIRECT DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 9, 1992, pages 2717-2722, XP000946427<br>ISSN: 0099-2240<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>---                                       | 1,3-6                         |
| A                                               | US 4 900 677 A (HEWITT PETER L)<br>13 février 1990 (1990-02-13)<br>exemples<br>---                                                                                                                                                                                                                                                    | 1,3-6                         |
| A                                               | RAYNAL A. ET AL.: "Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: Functional analysis in Escherichia coli."<br>MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 28, no. 2, avril 1998 (1998-04), pages 333-342, XP002166432<br>ISSN: 0950-382X<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>---                                            | 12-21,<br>42-53               |
| A                                               | MAIDAK BONNIE L ET AL: "A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)."<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 1, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 171-173, XP002166433<br>ISSN: 0305-1048<br>cité dans la demande<br>---                                                                                                  |                               |
| P,X                                             | FROSTEGARD ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 12, décembre 1999 (1999-12), pages 5409-5420, XP002148458<br>ISSN: 0099-2240<br>page 5410, colonne de gauche, ligne 32<br>-page 5412, colonne de droite, ligne 12<br>--- | 1,3,6,<br>30,61,<br>63,64     |
| P,X                                             | WO 99 67374 A (CAPPELLANO CARMELA ;GIUSINO FRANCESCO (IT); PUGLIA ANNA MARIA (IT))<br>29 décembre 1999 (1999-12-29)<br>cité dans la demande<br>---                                                                                                                                                                                    | 30,54,<br>61-67               |
| P,A                                             | le document en entier<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 42-53                         |
|                                                 | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                               |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 00/03311

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                       | no. des revendications visées |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| P,X       | <p>FROSTEGARD, ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils"</p> <p>APPL. ENVIRON. MICROBIOL. (1999), 65(12), 5409-5420,</p> <p>XP002166435</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p> | 1,3-6,30                      |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale n°  
PCT/FR 00/03311

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> 25 28 29 41 54-60 62-68 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup> rev. 1 3-5 (en totalité) et 6-21,25,28-30, 41-48 (toutes partiellement)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 25 28 29 41 54-60 62-68

Les revendications 25, 28 et 55 concernent un vecteur qui n'est défini que par sa présence dans une collection de vecteurs ou par le fait qu'il contienne un acide nucléique provenant d'une collection d'acides nucléiques. N'ayant aucune caractéristique structurelle ou autre permettant une recherche significative, ces revendications n'ont pas été recherchées. Il en est de même pour les revendications (ou les parties des revendications) 29, 41, 54 à 60 et 62 à 67 qui en dépendent. La revendication 68 concerne un composé caractérisé par son procédé d'obtention, et ainsi englobe tous les composés susceptibles d'être obtenus par ce procédé. Encore une fois, il n'y a aucune caractéristique permettant une recherche significative. De plus, le procédé lui-même (en tant que dépendant de la revendication 62) se base sur des composés non définis. La revendication 68 n'a donc pas été recherchée.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

. Invention 1. : Revendications 1 3-5 (en totalité)  
et 6-21,25,28-30,41-68 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol, tel que décrit dans la revendication 1; vecteurs et cellules hôte la contenant. Utilisation de cette collection pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un composé synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce composé.

. Invention 2. : Revendications 2 (en totalité) et  
6-21,25,28-30,41-68 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, tel que décrit dans la revendication 2; vecteurs et cellules hôte la contenant. Utilisation de cette collection pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un composé synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce composé.

. Invention 3. : Revendications 22-24 (en totalité)  
et 29 et 41 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon la revendication 22.

. Invention 4. : Revendications 26-27 (en totalité)  
et 29 et 41 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon la revendication 26.

. Invention 5. : Revendications 31-38,41,56-60,62-72,  
77-81 (toutes partiellement)

Acide nucléique caractérisé par SEQ ID 30, vecteurs et cellules hôte le contenant et l'exprimant, leurs utilisation pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un polykétide synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce polykétide.

Inventions 6. à 20. : Revendications 31-38,41, 56-60,62-72,77-81 (toutes partiellement)

Comme pour le sujet 5., mais en référence aux acides nucléiques caractérisés par les SEQ IDs 31 à 44 respectivement.

Inventions 21. : Revendications 31-38,41,56-60, 62-72,77-81 (toutes partiellement)

Comme pour le sujet 5., mais en référence aux acides nucléiques caractérisés par les SEQ IDs 115 à 120.

Invention 22. : Revendications 31-34,36-38,41, 56-60,62-69, 71-72 (toutes partiellement) et 39 et 40 (en totalité)

Acides nucléiques autres que les SEQ IDs 30 à 44, 60 à 106 ou 115 à 120, vecteurs et cellules hôte les contenant, leurs utilisations pour la détection d'acides nucléiques d'intérêt, de composés synthétisés par les protéines codées par ces acides nucléiques, ou de cellules produisant ces composés.

Invention 23. : Revendications 73 à 75

Procédé de détermination de la diversité des acides nucléiques contenus dans une collection.

Invention 24. : Revendication 76 (partiellement)

Acide nucléique comprenant une séquence d'ADNr 16S ayant au moins 99% d'identité avec SEQ ID 60.

Invention 25. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 61, 64 et 101.

12. revendication : Invention 26. : Revendication 76 (partiellement)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 62 et 69.

: Invention 27. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 63, 68 et 102.

. Invention 28. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 65.

Invention 29. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 66, 90 et 96.

Invention 30. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 67 et 91.

Invention 31. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 70, 80, 81, 97 et 103.

Invention 32. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 71 et 100.

. Invention 33. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 72 et 99.

Invention 34. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 73, 82, 88 et 89.

Invention 35. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 74.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Invention 36. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 75.

Invention 37. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 76.

: Invention 38. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 77.

Invention 39. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 78.

Invention 40. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 79.

Invention 41. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 83, 104 et 105.

Invention 42. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 84.

. Invention 43. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 85 et 92.

. Invention 44. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 86, 95 et 98.

Invention 45. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 87 et 106.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Invention 46. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 93 et 94.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/03311

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 9634112 A                                    | 31-10-1996             | AU 723619 B                             | 31-08-2000             |
|                                                 |                        | AU 5804996 A                            | 18-11-1996             |
|                                                 |                        | CA 2219136 A                            | 31-10-1996             |
|                                                 |                        | EP 0822990 A                            | 11-02-1998             |
|                                                 |                        | HU 9801871 A                            | 30-11-1998             |
|                                                 |                        | JP 11504218 T                           | 20-04-1999             |
|                                                 |                        | US 5824485 A                            | 20-10-1998             |
| WO 9920799 A                                    | 29-04-1999             | AU 1119399 A                            | 10-05-1999             |
|                                                 |                        | EP 1023466 A                            | 02-08-2000             |
| US 4900677 A                                    | 13-02-1990             | EP 0261956 A                            | 30-03-1988             |
|                                                 |                        | JP 63091093 A                           | 21-04-1988             |
| WO 9967374 A                                    | 29-12-1999             | AU 4609699 A                            | 10-01-2000             |
|                                                 |                        | EP 1090113 A                            | 11-04-2001             |

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) DEMANDE-INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 juin 2001 (07.06.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/040497 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/10, 15/52, 9/00, C12Q 1/68

60/209,800

7 juin 2000 (07.06.2000) US

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR00/03311

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

(22) Date de dépôt international :  
27 novembre 2000 (27.11.2000)

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JEAN-  
NIN, Pascale [FR/FR]; 52, rue Pierre Louvrier, F-92140  
Meudon (FR). PERNODET, Jean-Luc [FR/FR]; 21,  
rue des Jardins, F-94230 Cachan (FR). GUERINEAU,  
Michel [FR/FR]; 79, boulevard Saint Marcel, F-75013  
Paris (FR). SIMONET, Pascal [FR/FR]; 55, rue Pierre  
Voyant, F-69100 Villeurbanne (FR). COURTOIS, Sophie  
[FR/FR]; 165, rue de Paris, F-94220 Charenton le Pont

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
99/15032 29 novembre 1999 (29.11.1999) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING NUCLEIC ACIDS FROM AN ENVIRONMENT SAMPLE

(54) Titre : PROCÉDE D'OBTENTION D'ACIDES NUCLEIQUES A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE L'ENVIRONNE-  
MENT

DRY SIFTED SOIL  
Sol sec et tamisé

DETERMINING EXTRACELLULAR DNA : HOMOGENISING  
THE SOIL SUSPENSION (VORTEX)

1. Détermination de l'ADN extracellulaire:  
Homogénéisation de la suspension de sol (Vortex)

GRINDING THE DRY SOIL  
2. Broyage du sol sec.

HOMOGENISING THE SOIL SUSPENSION  
3. Homogénéisation de la suspension de sol

SONICATION WITH A MICROTIP  
4a. Sonication à l'aide d'une micro-pointe

LYSIS WITH LYSOZYME AND SDS  
5a. Lyse par le lysozyme et le SDS

SONICATION WITH A CUP HORN DEVICE  
4b. Sonication à l'aide du dispositif Cup Horn

LYSIS ON THE LYSOZYME AND SDS  
5b. Lyse sur le lysozyme et le SDS

WO 01/040497 A3

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing nucleic acids from an environment sample, more particularly a method for obtaining a library of nucleic acids from a sample. The invention also concerns nucleic acids of nucleic acid libraries obtained by said method their use in the synthesis of novel compounds, in particular novel compounds of therapeutic interest. The invent further concerns novel means used in the method for obtaining said nucleic acids, such as novel vectors and novel processes for preparing such vectors or recombinant host cells containing said nucleic acid. Finally, the invention concerns methods for detecting a nucleic acid of interest within a library of nucleic acids resulting from said method, and nucleic acids detected by said method and polypeptides encoded by said nucleic acids.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de préparation d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, plus particulièrement un procédé d'obtention d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon. L'invention est également relative aux acides nucléiques ou aux collections d'acides nucléiques obtenus selon le procédé et leur application à la synthèse

[Suite sur la page suivante]



(FR). **CAPPELLANO, Carmela** [FR/FR]; 16, rue de Neuilly, F-94120 Fontenay sous Bois (FR). **FRANCOU, François** [FR/FR]; 76, boulevard de Lozère, F-91120 Palaiseau (FR). **RAYNAL, Alain** [FR/FR]; 52, avenue des Tilleuls, F-91440 Bures sur Yvette (FR). **BALL, Maria** [VE/VE]; Avenue Cardenal Quintera, Res. Cardenal Quintero, Edif. 10, Piso 4, Apto 42, Merida. Edo., Merida (VE). **SEZONOV, Guennadi** [RU/FR]; 16, rue Saint Sauveur, F-75002 Paris (FR). **TUPHILE, Karine** [FR/FR]; 39/41, boulevard Dubreuil, F-91400 Orsay (FR). **FROSTEGARD, Asa** [NO/NO]; Flateby Skogsvei 7, N-1450 Nesoddtangen (NO).

(74) **Mandataire : BOUVET, Philippe**; Aventis Pharma S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).

(81) **États désignés (national)** : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **États désignés (régional)** : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale

(88) **Date de publication du rapport de recherche internationale:**

17 octobre 2002

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

de nouveaux composés, notamment de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique. L'invention a également pour objet les moyens nouveaux mis en oeuvre dans le procédé d'obtention d'acides nucléiques ci-dessus, tels que de nouveaux vecteurs et des nouveaux procédés de préparation de tels vecteurs ou encore des cellules hôtes recombinantes comprenant un acide nucléique de l'invention. L'invention concerne encore des procédés pour détecter un acide nucléique d'intérêt au sein d'une collection d'acides nucléiques obtenus selon le procédé ci-dessus, ainsi que les acides nucléiques détectés par un tel procédé et les polypeptides codés par de tels acides nucléiques.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/03311

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C12N15/52 C12N9/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                     | Relevant to claim No.                  |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | WO 96 34112 A (CHROMAXOME CORP)<br>31 October 1996 (1996-10-31)<br>cited in the application<br><br>page 72 -page 76<br>page 84, line 30 -page 91, line 22<br>claims<br><br>---<br>-/-- | 1,6,7,<br>10,11,<br>30,54,<br>61,63-67 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2001

Date of mailing of the international search report

15.06.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ANDRES S.M.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/03311

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                            |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No.      |
| X                                                    | SEOW KAH-TONG ET AL: "A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 179, no. 23, December 1997 (1997-12),<br>pages 7360-7368, XP002148456<br>ISSN: 0021-9193<br>cited in the application<br>the whole document | 7,8,10,<br>30,61,<br>63-67 |
| X                                                    | WO 99 20799 A (RONDON MICHELLE R<br>;HANDELSMAN JO (US); GOODMAN ROBERT M<br>(US); WISC) 29 April 1999 (1999-04-29)<br>cited in the application<br>examples 4,6<br>page 5, line 15 -page 6<br>page 17 -page 29<br>page 36 -page 48<br>claims                                                                                                                         | 7-11,30,<br>61,65,67       |
| A                                                    | PAGET ERIC ET AL: "The fate of recombinant plant DNA in soil."<br>EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY,<br>vol. 34, no. 2, April 1998 (1998-04),<br>pages 81-88, XP000946574<br>ISSN: 1164-5563<br>page 83, paragraph 2.3.                                                                                                                                               | 1,3-6                      |
| A                                                    | MILLER DN. ET AL.: "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples."<br>APPL ENVIRON MICROBIOL 1999<br>NOV;65(11):4715-24,<br>XP002148457<br>the whole document                                                                                                                                             | 1,3-6                      |
| A                                                    | CLERC SYLVIE ET AL: "Efficiency of the transfer of a pSAM2-derivative plasmid between two strains of Streptomyces lividans in conditions ranging from agar slants to non-sterile soil microcosms."<br>FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY,<br>vol. 21, no. 3, 1996, pages 157-165,<br>XP000946441<br>ISSN: 0168-6496<br>the whole document                                     | 7-21,<br>42-53             |
|                                                      | ---<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                            |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03311

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                           |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No.     |
| A                                                    | PICARD C ET AL: "DETECTION AND ENUMERATION OF BACTERIA IN SOIL BY DIRECT DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 58, no. 9, 1992, pages 2717-2722,<br>XP000946427<br>ISSN: 0099-2240<br>cited in the application<br>the whole document                                   | 1,3-6                     |
| A                                                    | US 4 900 677 A (HEWITT PETER L)<br>13 February 1990 (1990-02-13)<br>examples                                                                                                                                                                                                                                                      | 1,3-6                     |
| A                                                    | RAYNAL A. ET AL.: "Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: Functional analysis in Escherichia coli."<br>MOLECULAR MICROBIOLOGY,<br>vol. 28, no. 2, April 1998 (1998-04),<br>pages 333-342, XP002166432<br>ISSN: 0950-382X<br>cited in the application<br>the whole document                                        | 12-21,<br>42-53           |
| A                                                    | MAIDAK BONNIE L ET AL: "A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)."<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 27, no. 1,<br>1 January 1999 (1999-01-01), pages<br>171-173, XP002166433<br>ISSN: 0305-1048<br>cited in the application                                                                                        |                           |
| P,X                                                  | FROSTEGARD ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 65, no. 12, December 1999 (1999-12),<br>pages 5409-5420, XP002148458<br>ISSN: 0099-2240<br>page 5410, left-hand column, line 32 -page<br>5412, right-hand column, line 12 | 1,3,6,<br>30,61,<br>63,64 |
| P,X                                                  | WO 99 67374 A (CAPPELLANO CARMELA ;GIUSINO FRANCESCO (IT); PUGLIA ANNA MARIA (IT))<br>29 December 1999 (1999-12-29)<br>cited in the application                                                                                                                                                                                   | 30,54,<br>61-67           |
| P,A                                                  | the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 42-53                     |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03311

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X        | <p>FROSTEGARD, ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils"</p> <p>APPL. ENVIRON. MICROBIOL. (1999), 65(12), 5409-5420,</p> <p>XP002166435</p> <p>the whole document -----</p> | 1,3-6,30              |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00/03311

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **25 28 29 41 54-60 62-68**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplementary sheet FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM  
PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplementary sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims: 1, 3, 5 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-40 (all partly)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims nos.: 25, 28, 29, 41, 54-60, 62-68

Claims 25, 28 and 55 concern a vector which is only defined by its presence in a collection of vectors or by the fact that it contains a nucleic acid derived from a collection of nucleic acids. Since it does not have any structural characteristic or any other property enabling a meaningful search, those claims were not searched. The same applies to Claims (or parts of claims) 29, 41, 54 to 60 and 62 to 67 which are dependent thereon. Claim 68 concerns a compound characterised by the method for obtaining it, and thereby includes all the compounds capable of being obtained by said method. Once again, there is no characteristic enabling a meaningful search. Moreover, the method itself (being dependent on Claim 62) is based on compounds which are not defined. Therefore no search was carried for Claim 68.

The applicant's attention is drawn to the fact that, claims or parts of claims, relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

Invention 1.: Claims 1, 3-5 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-68 (all partly)

Method for preparing a collection of nucleic acids from a soil sample, such as described in Claim 1; vectors and host cells containing same. Use of said collection for detecting a nucleic acid of interest, a compound synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said compound.

Invention 2. : Claims 2 (completely) and 6-21, 25, 28-30, 41-68 (all partly)

Method for preparing a collection of nucleic acids from an environment sample, such as described in Claim 2; vectors and host cells containing same. Use of said collection for detecting a nucleic acid of interest, a compound synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said compound.

Invention 3.: Claims 22-24 (completely) and 29 and 41 (all partly)

Preparation of a recombinant vector as per Claim 22.

Invention 4. : Claims 26-27 (completely) and 29 and 41 (all partly)

Method for preparing a recombinant vector as per Claim 26

Invention 5. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Nucleic acid characterised by SEQ ID 30 and host cells containing and expressing same, their use for detecting a nucleic acid of interest, a polyketide synthesized by the protein(s) encoded by said nucleic acid, or a cell producing said polyketide.

Inventions 6. to 20. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Same as for subject 5., but with reference to SEQ ID's 31 to 44 respectively.

Invention 21. : Claims 31-38, 41, 56-60, 62-72, 77-81 (all partly)

Same as for subject 5., but with reference to nucleic acids characterised by SEQ ID's 115 to 120

Invention 22. : Claims 31-34, 36-38, 41, 56-50, 62-69, 71-72 (all partly) and 39 and 40 (completely)

Nucleic acids other than SEQ ID's 30 to 44, 60 to 106, 115 to 120, vectors and host cells containing same, their uses for detecting nucleic acids of interest, of compounds synthesized by the proteins encoded by said nucleic acids, or cells producing said compounds.

Invention 23. : Claims 73 to 75

Method for determining diversity of nucleic acids contained in a collection

Invention 24. : Claim 76 (partly)

Nucleic acid comprising an rDNA 16S sequence having at least 99% identity with SEQ ID 60.

Invention 25. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 61, 64, and 101

Invention 26. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 62 and 69.

Invention 27. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 63, 68 and 102.

Invention 28. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 65.

Invention 29. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 66, 90 and 96.

Invention 30. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 67 and 91.

Invention 31. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 70, 80, 81, 97 and 103.

Invention 32. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 71 and 100.

Invention 33. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 72 and 99.

Invention 34. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 73, 82, 88 and 89.

Invention 35. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 74.

Invention 36. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 75.

Invention 37. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 76.

Invention 38. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 77.

Invention 39. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 78.

Invention 40. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 79.

Invention 41. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 83, 104 and 105.

Invention 42. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID 84.

Invention 43. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 85 and 92.

Invention 44. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 86, 95 and 98.

Invention 45. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 87 and 106.

Invention 46. : Claim 76 (partly)

Same as for subject 24., but concerning SEQ ID's 93 and 94.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 00/03311

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                   | Publication<br>date                                                                            |
|-------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 9634112 A                              | 31-10-1996          | AU 723619 B<br>AU 5804996 A<br>CA 2219136 A<br>EP 0822990 A<br>HU 9801871 A<br>JP 11504218 T<br>US 5824485 A | 31-08-2000<br>18-11-1996<br>31-10-1996<br>11-02-1998<br>30-11-1998<br>20-04-1999<br>20-10-1998 |
| WO 9920799 A                              | 29-04-1999          | AU 1119399 A<br>EP 1023466 A                                                                                 | 10-05-1999<br>02-08-2000                                                                       |
| US 4900677 A                              | 13-02-1990          | EP 0261956 A<br>JP 63091093 A                                                                                | 30-03-1988<br>21-04-1988                                                                       |
| WO 9967374 A                              | 29-12-1999          | AU 4609699 A<br>EP 1090113 A                                                                                 | 10-01-2000<br>11-04-2001                                                                       |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/03311

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**

CIB 7 C12N15/10 C12N15/52 C12N9/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                       | no. des revendications visées                    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| X           | <p>WO 96 34112 A (CHROMAXOME CORP)<br/>31 octobre 1996 (1996-10-31)<br/>cité dans la demande</p> <p>page 72 -page 76<br/>page 84, ligne 30 -page 91, ligne 22<br/>revendications</p> <p style="text-align: center;">---<br/>-/--</p> | <p>1,6,7,<br/>10,11,<br/>30,54,<br/>61,63-67</p> |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**° Catégories spéciales de documents cités:**

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de l'invention

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mai 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15.06.01

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ANDRES S.M.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/R 00/03311

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                               |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                                                       | no. des revendications visées |
| X                                               | SEOW KAH-TONG ET AL: "A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms."<br>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 23, décembre 1997 (1997-12), pages 7360-7368, XP002148456<br>ISSN: 0021-9193<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>--- | 7,8,10,<br>30,61,<br>63-67    |
| X                                               | WO 99 20799 A (RONDON MICHELLE R ;HANDELSMAN JO (US); GOODMAN ROBERT M (US); WISC) 29 avril 1999 (1999-04-29)<br>cité dans la demande<br>exemples 4,6<br>page 5, ligne 15 -page 6<br>page 17 -page 29<br>page 36 -page 48<br>revendications<br>---                                                                                                                   | 7-11,30,<br>61,65,67          |
| A                                               | PAGET ERIC ET AL: "The fate of recombinant plant DNA in soil."<br>EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY, vol. 34, no. 2, avril 1998 (1998-04), pages 81-88, XP000946574<br>ISSN: 1164-5563<br>page 83, alinéa 2.3.<br>---                                                                                                                                                 | 1,3-6                         |
| A                                               | MILLER DN. ET AL.: "Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples."<br>APPL ENVIRON MICROBIOL 1999 NOV;65(11):4715-24,<br>XP002148457<br>le document en entier<br>---                                                                                                                                      | 1,3-6                         |
| A                                               | CLERC SYLVIE ET AL: "Efficiency of the transfer of a pSAM2-derivative plasmid between two strains of Streptomyces lividans in conditions ranging from agar slants to non-sterile soil microcosms."<br>FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, vol. 21, no. 3, 1996, pages 157-165, XP000946441<br>ISSN: 0168-6496<br>le document en entier<br>---                                 | 7-21,<br>42-53                |
|                                                 | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                               |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                                                                                                                              | no. des revendications visées |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| A         | PICARD C ET AL: "DETECTION AND ENUMERATION OF BACTERIA IN SOIL BY DIRECT DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION"<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 58, no. 9, 1992, pages 2717-2722,<br>XP000946427<br>ISSN: 0099-2240<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>---                                       | 1,3-6                         |
| A         | US 4 900 677 A (HEWITT PETER L)<br>13 février 1990 (1990-02-13)<br>exemples<br>---                                                                                                                                                                                                                                                          | 1,3-6                         |
| A         | RAYNAL A. ET AL.: "Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: Functional analysis in Escherichia coli."<br>MOLECULAR MICROBIOLOGY,<br>vol. 28, no. 2, avril 1998 (1998-04),<br>pages 333-342, XP002166432<br>ISSN: 0950-382X<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>---                                            | 12-21,<br>42-53               |
| A         | MAIDAK BONNIE L ET AL: "A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)."<br>NUCLEIC ACIDS RESEARCH,<br>vol. 27, no. 1,<br>1 janvier 1999 (1999-01-01), pages<br>171-173, XP002166433<br>ISSN: 0305-1048<br>cité dans la demande<br>---                                                                                               |                               |
| P,X       | FROSTEGARD ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 65, no. 12, décembre 1999 (1999-12),<br>pages 5409-5420, XP002148458<br>ISSN: 0099-2240<br>page 5410, colonne de gauche, ligne 32<br>-page 5412, colonne de droite, ligne 12<br>--- | 1,3,6,<br>30,61,<br>63,64     |
| P,X       | WO 99 67374 A (CAPPELLANO CARMELA ;GIUSINO FRANCESCO (IT); PUGLIA ANNA MARIA (IT))<br>29 décembre 1999 (1999-12-29)<br>cité dans la demande<br>le document en entier<br>---                                                                                                                                                                 | 30,54,<br>61-67               |
| P,A       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 42-53                         |
|           | ---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                               |
|           | -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                               |

# RAPPORT RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête internationale No  
PCT/FR 00/03311

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |                                                                                                                                                                                                                                      |                               |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                                                                                                                                       | no. des revendications visées |
| P,X                                             | <p>FROSTEGARD, ASA ET AL: "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils"</p> <p>APPL. ENVIRON. MICROBIOL. (1999), 65(12), 5409-5420,</p> <p>XP002166435</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p> | 1,3-6,30                      |

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR 00/03311

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n°s 25 28 29 41 54-60 62-68  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s  
rev. 1 3-5 (en totalité) et 6-21,25,28-30, 41-48 (toutes partiellement)

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 25 28 29 41 54-60 62-68

Les revendications 25, 28 et 55 concernent un vecteur qui n'est défini que par sa présence dans une collection de vecteurs ou par le fait qu'il contienne un acide nucléique provenant d'une collection d'acides nucléiques. N'ayant aucune caractéristique structurale ou autre permettant une recherche significative, ces revendications n'ont pas été recherchées. Il en est de même pour les revendications (ou les parties des revendications) 29, 41, 54 à 60 et 62 à 67 qui en dépendent. La revendication 68 concerne un composé caractérisé par son procédé d'obtention, et ainsi englobe tous les composés susceptibles d'être obtenus par ce procédé. Encore une fois, il n'y a aucune caractéristique permettant une recherche significative. De plus, le procédé lui-même (en tant que dépendant de la revendication 62) se base sur des composés non définis. La revendication 68 n'a donc pas été recherchée.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

. Invention 1. : Revendications 1 3-5 (en totalité)  
et 6-21,25,28-30,41-68 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de sol, tel que décrit dans la revendication 1; vecteurs et cellules hôte la contenant. Utilisation de cette collection pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un composé synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce composé.

. Invention 2. : Revendications 2 (en totalité) et  
6-21,25,28-30,41-68 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'une collection d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de l'environnement, tel que décrit dans la revendication 2; vecteurs et cellules hôte la contenant. Utilisation de cette collection pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un composé synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce composé.

. Invention 3. : Revendications 22-24 (en totalité)  
et 29 et 41 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon la revendication 22.

. Invention 4. : Revendications 26-27 (en totalité)  
et 29 et 41 (toutes partiellement)

Procédé de préparation d'un vecteur recombinant selon la revendication 26.

. Invention 5. : Revendications 31-38,41,56-60,62-72,  
77-81 (toutes partiellement)

Acide nucléique caractérisé par SEQ ID 30, vecteurs et cellules hôte le contenant et l'exprimant, leurs utilisation pour la détection d'un acide nucléique d'intérêt, d'un polykétide synthétisé par la/les protéine(s) codé(es) par

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

cet acide nucléique, ou d'une cellule produisant ce polykétide.

Inventions 6. à 20. : Revendications 31-38,41, 56-60,62-72,77-81 (toutes partiellement)

Comme pour le sujet 5., mais en référence aux acides nucléiques caractérisés par les SEQ IDs 31 à 44 respectivement.

Inventions 21. : Revendications 31-38,41,56-60, 62-72,77-81 (toutes partiellement)

Comme pour le sujet 5., mais en référence aux acides nucléiques caractérisés par les SEQ IDs 115 à 120.

Invention 22. : Revendications 31-34,36-38,41, 56-60,62-69, 71-72 (toutes partiellement) et 39 et 40 (en totalité)

Acides nucléiques autres que les SEQ IDs 30 à 44, 60 à 106 ou 115 à 120, vecteurs et cellules hôte les contenant, leurs utilisations pour la détection d'acides nucléiques d'intérêt, de composés synthétisés par les protéines codées par ces acides nucléiques, ou de cellules produisant ces composés.

Invention 23. : Revendications 73 à 75

Procédé de détermination de la diversité des acides nucléiques contenus dans une collection.

Invention 24. : Revendication 76 (partiellement)

Acide nucléique comprenant une séquence d'ADNr 16S ayant au moins 99% d'identité avec SEQ ID 60.

Invention 25. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 61, 64 et 101.

12. revendication : Invention 26. : Revendication 76 (partiellement)

## SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 62 et 69.

: Invention 27. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 63, 68 et 102.

. Invention 28. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 65.

Invention 29. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 66, 90 et 96.

Invention 30. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 67 et 91.

Invention 31. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 70, 80, 81, 97 et 103.

Invention 32. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 71 et 100.

. Invention 33. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 72 et 99.

Invention 34. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 73, 82, 88 et 89.

. Invention 35. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 74.



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Invention 36. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 75.

Invention 37. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 76.

. Invention 38. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 77.

Invention 39. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 78.

Invention 40. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 79.

Invention 41. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 83, 104 et 105.

Invention 42. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant SEQ ID 84.

. Invention 43. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 85 et 92.

. Invention 44. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 86, 95 et 98.

Invention 45. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 87 et 106.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Invention 46. : Revendication 76 (partiellement)

Comme pour le sujet 24., mais concernant les SEQ IDs 93 et 94.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête Internationale No

PCT/FR 00/03311

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|---|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| WO 9634112                                      | A | 31-10-1996             | AU 723619 B                             | 31-08-2000             |
|                                                 |   |                        | AU 5804996 A                            | 18-11-1996             |
|                                                 |   |                        | CA 2219136 A                            | 31-10-1996             |
|                                                 |   |                        | EP 0822990 A                            | 11-02-1998             |
|                                                 |   |                        | HU 9801871 A                            | 30-11-1998             |
|                                                 |   |                        | JP 11504218 T                           | 20-04-1999             |
|                                                 |   |                        | US 5824485 A                            | 20-10-1998             |
| WO 9920799                                      | A | 29-04-1999             | AU 1119399 A                            | 10-05-1999             |
|                                                 |   |                        | EP 1023466 A                            | 02-08-2000             |
| US 4900677                                      | A | 13-02-1990             | EP 0261956 A                            | 30-03-1988             |
|                                                 |   |                        | JP 63091093 A                           | 21-04-1988             |
| WO 9967374                                      | A | 29-12-1999             | AU 4609699 A                            | 10-01-2000             |
|                                                 |   |                        | EP 1090113 A                            | 11-04-2001             |

**THIS PAGE BLANK (USP10;**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USP 10;**